

**Untersuchungen zum Nachweis der Advanced
Glycation Endproducts (AGEs) Pentosidin und Nε-
Carboxymethyl-Lysin (CML) in Serum und Synovia
bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Markus Köhler
geboren am 29. Oktober 1975 in Sondershausen

Gutachter

1. Prof. Dr. G. Hein, Jena
2. Prof. Dr. R. Bräuer, Jena
3. Prof. Dr. C. Baerwald, Leipzig

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.Juli 2005

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µmol	Mikromol
a	Jahr
AIDS	acquired immune deficiency syndrom
ACR	American College of Rheumatology
AGEs	advanced glycation endproducts
BSA	bovines Serum-Albumin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CD	cluster of differentiation
CGRP	calcitonin-gene-related-peptide
CML	Nε-Carboxymethyl-Lysin
COX	Cyclooxygenase
CrP	C-reaktives Protein
DMARD	disease modifying antirheumatic drugs
DNA	desoxyribonucleinacid
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
g	Gramm
GM-CSF	granulocytes macrophages colony stimulating faktor
GPT	Gigapartikel
h	Stunde
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	human leucocyte antigen
HMGB	high-mobility-group-box
HPLC	high performance liquid chromatography
IFN-γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1Ra	Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist
IU	international units

I κ B	inhibitor of nuclear factor κ B
kDa	Kilodalton
l	Liter
LIF	leukemia inhibitory factor
m	Molar
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
ml	Milliliter
mm	Millimeter
N	Anzahl
n	Normal
N ₂	Stickstoff
NF κ B	nuclear factor κ B
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatica
p _P	Signifikanz des Korrelationsfaktor nach Pearson
p _S	Signifikanz des Korrelationsfaktor nach Spearman
PBS	phosphate buffered saline
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylflorid
PTEN	phosphatase and tensin homologue on chromosome ten
r _P	Korrelationsfaktor nach Pearson
r _S	Korrelationsfaktor nach Spearman
RA	Rheumatoide Arthritis
RAGE	receptor of AGE
RF	Rheumafaktor
RF-neg	Rheumafaktor-negativ
RF-pos	Rheumafaktor-positiv
SAP	signalling lymphocytic activation molecule associated protein
SCID	severe combined immunodeficiency
SLE	systemische Lupus erythematoses
SpA	seronegative Spondylarthritiden und reaktive Arthritis
TGF- β	tissue growth factor β

TNF- α	tumor necrosis faktor α
VCAM-1	vascular cells adhesion molecule 1
VIP	vasoactive intestinal peptide
VLA-4	very late antigen 4

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG	3
2.1 Rheumatoide Arthritis	3
2.1.1 Definition	3
2.1.2 Verlauf und Prognose	3
2.1.3 Häufigkeit und Geschlechtsverteilung	5
2.1.4 Pathogenese der RA	5
2.1.5 Therapie der RA	11
2.2 AGEs	14
2.2.1 Begriffserklärung	14
2.2.2 Biochemie der AGEs	14
2.2.3 Wirkung der AGEs	16
2.2.4 Vorkommen der AGEs	18
2.3 Rheumatoide Arthritis und AGEs	20
2.3.1 Spiegelvergleiche	20
2.3.2 Lokalisation von CML	23
2.3.3 Bedeutung der AGE-modifizierten Immunglobuline und deren Antikörper	23
3 ZIELE DER ARBEIT.	25
4 PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN	26
4.1 Patienten	26
4.1.1 Allgemeine Probandenbeschreibung	26
4.1.2 RA-Patienten	27
4.1.3 Arthrose-Patienten	27
4.1.4 SpA-Patienten	27
4.1.5 Gesunde Vergleichspersonen	28
4.1.6 Gruppenvergleiche	28
4.2 Geräte und Chemikalien	29

4.2.1 Geräte	29
4.2.2 Chemikalien	29
4.3 Methoden	29
4.3.1 Probengewinnung und Aufbewahrung	29
4.3.2 Pentosidin-Bestimmung	30
4.3.3 CML-Bestimmung	30
4.3.4 Bestimmung von Proteingehalt, CrP und Kreatinin	32
4.3.5 Bestimmung der BSG	32
4.3.6 Bestimmung der Synovia-Zellzahl	32
4.3.7 Bestimmung des Rheumafaktors	33
4.3.8 Einteilung in die Röntgenstadien	33
4.3.9 Statistische Auswertung	33
 5 ERGEBNISSE	 35
5.1 Vergleich von Pentosidin und CML von RA-Patienten mit Patienten, die an anderen Gelenkerkrankungen leiden sowie Gesunden	35
5.1.1 Gesamtübersicht	35
5.1.2 Vergleich RA mit Arthrose	37
5.1.3 Vergleich RA mit SpA	38
5.1.4 Vergleich RA mit Gesunden	40
5.1.5 Vergleich Gesunde mit Arthrose	41
5.1.6 Vergleich Gesunde mit SpA	43
5.2 Zusammenhang zwischen Pentosidin als auch CML und klinischen sowie paraklinischen Parametern bei RA-Patienten	44
5.2.1 Zusammenhang zwischen Serum- und Synovia-Spiegel von Pentosidin sowie CML	44
5.2.2 Abhängigkeit des Pentosidin und CML von der Krankheitsdauer und dem Alter	46
5.2.3 Abhängigkeit des Pentosidin und CML vom Gelenkdestruktionsgrad .	47
5.2.4 Abhängigkeit des Pentosidin und CML von der entzündlichen Aktivität .	49
5.2.5 Abhängigkeit des Pentosidin und CML vom Rheumafaktor	50
 6 DISKUSSION	 52
6.1 Bedeutung der AGEs	52
6.2 RA und AGEs	55
6.2.1 Vergleich RA mit anderen Gelenkkrankheiten und Gesunden	55

6.2.2 Zusammenhang von klinischen sowie paraklinischen Kriterien und AGEs bei RA	59
--	----

7 SCHLUSSFOLGERUNG.	65
----------------------------	-----------

8 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS	67
--	-----------

9 LEBENSLAUF	91
---------------------	-----------

10 DANKSAGUNG	93
----------------------	-----------

11 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	94
------------------------------------	-----------

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die Rheumatoide Arthritis stellt eine Erkrankung mit erheblicher Bedeutung für den Betroffenen und auch für die Gesellschaft dar. Somit ist die Erforschung der Pathogenese sowie Ätiologie und der daraus ableitbaren therapeutischen Ansätze sehr wichtig.

Einen Beitrag zur Pathogenese kann auch das AGE-Konzept liefern. Es beschreibt die Auswirkung der Glycierung von Proteinen. Die nicht-enzymatische Reaktion mündet in einer irreversiblen Quervernetzung von Proteinen. Diese zur Quervernetzung beitragenden chemischen Verbindungen, die AGEs, haben ein erhebliches pathogenetisches Potential. Sie verursachen oxidativen Stress und in Folge dessen eine Zytokin-Dysbalance. Auch der oxidative Stress begünstigt eine weitere AGE-Bildung. Es entsteht ein Circulus vitiosus. Diesen zu durchbrechen, offenbart einen gewinnbringenden therapeutischen Ansatz. Des weiteren könnten die AGEs Neoepitope darstellen, die über immunologische Prozesse zur Ausbildung einer RA führen könnten.

In der hier vorgelegten Arbeit sollte die Bedeutung der AGEs bei der RA im Vergleich zu anderen Gelenkerkrankungen und Gesunden untersucht werden. Aus der großen Gruppe der AGE-Modifikationen wurden das Pentosidin und das CML, das N ϵ -Carboxymethyl-Lysin untersucht. Die Pentosidin-Spiegel wurden mit Hilfe einer HPLC-Methode bestimmt. Zur Untersuchung des CML stand ein kompetitives ELISA-System zur Verfügung.

Die RA-Patienten erreichten die höchsten Pentosidin-Spiegel im Serum als auch in der Synovia. Signifikant war dieser Unterschied für den Vergleich der Serum-Pentosidin-Spiegel von RA-Patienten mit SpA-Patienten und Gesunden. Als Ursache hierfür lässt sich ein ausgeprägter oxidativer Stress bei der RA vermuten aber auch ein höherer Anteil immunpathogener Quervernetzungen.

Die höchsten CML-Spiegel im Serum fanden sich bei Gesunden. Der Unterschied zu den RA-Patienten war signifikant.

Der Pentosidin- als auch der CML-Spiegel erreicht im Serum höhere Werte als in der Synovia. Ursache hierfür könnten sowohl spezifische Bindungsprozesse im Gelenk als auch eine systemische Mehrproduktion sein.

Arthrose- sowie SpA-Patienten erreichen höhere Serum-Pentosidin-Spiegel aber niedrigere Serum-CML-Spiegel als gesunde Vergleichspersonen. Dieser Unterschied ist aber nicht statistisch sicher. Auch hier könnte die Pentosidin-Erhöhung durch den oxidativen Stress und die CML-Erniedrigung durch einen anderen Metabolismus oder ein anderes Bindungsverhalten verursacht werden.

Bei den RA-Patienten fand sich eine positive signifikante Korrelation zwischen der Krankheitsdauer und dem Synovia-Pentosidin-Spiegel. Das heißt, dass sich das Pentosidin mit zunehmender Krankheitsdauer in der Synovia anreichert. Da es keine Korrelation mit dem Alter gibt, wird hier der Einfluss der RA auf die Pentosidin-Bildung deutlich.

Der Pentosidin-Spiegel steigt bei RA-Patienten mit zunehmendem Röntgenstadium, welches nach Steinbrocker eingeteilt wurde, an. Auch hieran wird deutlich, dass die Ausprägung der RA die Pentosidin-Spiegel beeinflusst.

Der Zusammenhang zwischen den AGE-Spiegeln und den systemischen und lokalen Entzündungsmarkern wurde ebenfalls untersucht, wenn gleich dieser Vergleich problematisch erscheint, da hier schnell reagierende Parameter, die Entzündungsmarker, mit trägen, langfristig kumulativen Parametern verglichen werden. Es fand sich dennoch eine positive signifikante Korrelation des Serum-Pentosidin mit der BSG sowie dem CrP, also systemischen Entzündungsmarkern, nicht aber mit der Synovia-Zellzahl, einem lokalen Entzündungsmarkern.

Die Rheumafaktoren haben wie die AGEs einen eher trägen Reaktionscharakter. Eine positive signifikante Korrelation fand sich zwischen dem Serum- als auch dem Synovia-CML mit dem Rheumafaktor.

In der vorgelegten Arbeit wird deutlich, dass es bei der RA zu einer erhöhten Bildung der AGEs kommt, die auch die Pathogenese und Ätiologie beeinflussen können. Damit erscheinen therapeutische Ansätze sinnvoll, die auf das AGE-Konzept abzielen. Ob es möglich sein wird, kausal angreifende Medikamente zu entwickeln ist offen, aber bereits eine positive Modifikation des Krankheitsverlaufs wäre für den betroffenen Patienten segensreich.

2 EINLEITUNG

2.1 Rheumatoide Arthritis

2.1.1 Definition

Die Rheumatoide Arthritis ist eine chronisch verlaufende entzündliche Erkrankung, die verschiedene Organsysteme in Mitleidenschaft ziehen kann, sich aber vordergründig als symmetrische Polyarthritits manifestiert. Wegen des in der Regel chronischen und progredienten Verlaufs wird sie im deutschsprachigen Raum auch als chronische Polyarthritits bezeichnet. Die sich etablierende Synovitis kann zu ausgeprägter Knorpel- und Knochen-erosion bzw. -destruktion führen, aus denen typische Gelenkdeformitäten resultieren. Die Ausprägung der Erkrankung ist allerdings von Patient zu Patient sehr verschieden, so dass es einerseits gering symptomatische Verläufe ohne bleibende Gelenkschäden gibt, aber auch langwierige schwere Verläufe, die zu einer erheblichen Beeinträchtigung der physischen, psychischen aber auch sozialen Funktion mit Frühinvalidisierung führen.

2.1.2 Verlauf und Prognose

Die meisten Patienten erleben eine persistierende, in ihrer Ausprägung schwankende Entzündungsaktivität, aus der ein unterschiedlicher Grad radiologisch aber auch klinisch fassbarer Zerstörung der Gelenke resultiert. Nach einem Verlauf von 10 bis 12 Jahren ist es bei 80 % der Patienten zu einer Gelenkdeformation gekommen, wobei die größte Progression innerhalb der ersten 6 Jahre stattfindet (Lipsky 1998). Ein kurzfristiger Verlauf ist nur in 15 % der Fälle zu verzeichnen (Lipsky 1998).

Der Begriff der funktionellen Kapazität beschreibt die aus mehreren Ursachen resultierende (Rest-)Beweglichkeit des Patienten und ist ein geeignetes Instrument zur Verlaufsbeurteilung hinsichtlich der unmittelbaren Bedeutung für den Patienten selbst. Die funktionelle Kapazität wird vordergründig durch zwei Entitäten bestimmt. Zum einen durch die entzündliche Aktivität der Arthritis und zum anderen durch die Gelenkdestruktion. Beide verursachen eine Behinderung des Patienten.

Zu Beginn des Krankheitsverlaufes ist die entzündliche Aktivität ausschlaggebend. Sie hat zu diesem Zeitpunkt bezogen auf die Dauer der Erkrankung ihr Maximum. Nach wenigen Jahren des Verlaufs pegelt sie sich dann auf einem erhöhten Niveau ein. Im Vergleich dazu erscheint der Einfluss der Gelenkzerstörung deutlich geringer (Welsing et al. 2001).

In späteren Krankheitsstadien kehrt sich das Verhältnis um. Die entscheidende Bedeutung erlangt die Destruktion der Gelenke, die kontinuierlich voranschreitet. Die entzündliche

Aktivität hat in diesem Stadium einen geringeren Anteil an der Einschränkung der funktionellen Kapazität (Welsing et al. 2001). Schließlich können sogenannte „ausgebrannte“ Formen resultieren mit weitgehend fehlender Entzündungsaktivität.

Aus dem eben Beschriebenen resultiert zusammengefasst im Allgemeinen eine stetige Verschlechterung der funktionellen Kapazität.

Es sind von mehreren Autoren verschiedene Faktoren beschrieben worden, die zu einem eher ungünstigen Verlauf prädisponieren. Bei Frauen kommt es zu einer ausgeprägteren Einschränkung der funktionellen Kapazität im Vergleich zu Männern. Dieser Unterschied verschärft sich noch mit dem postmenopausalen Status der Frauen. Einen ebenfalls negativen Einfluss hat das fortgeschrittene Alter der Patienten (Kuiper et al. 2001, Uhlig et al. 2000).

Auch die Psyche der Betroffenen lässt das Ausmaß der Einschränkung der funktionellen Kapazität nicht unbeeinflusst (Uhlig et al. 2000).

Ein positiver Rheumafaktornachweis und eine erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit, also eine gesteigerte entzündliche Aktivität, sprechen für ein ausgeprägteres Fortschreiten der radiologisch nachweisbaren Destruktion (Uhlig et al. 2000). Hieran kann man erkennen, dass die Entzündungsaktivität und die Gelenkzerstörung in engem Zusammenhang stehen. Bei fortgeschrittener Krankheitsdauer ist zwar die Gelenkdestruktion entscheidender für das Ausmaß der funktionellen Kapazität, zu einer verstärkten Gelenkdestruktion trägt aber trotzdem eine erhöhte entzündliche Aktivität bei (Drossaers-Bakker et al. 1999). Wie später beschrieben wird, kann folglich auch das AGE-Konzept durch die Akzelerierung des oxidativen Stresses bei Entzündung einen Einfluss auf den gesamten Krankheitsverlauf haben und eventuell auch für therapeutische Ansätze genutzt werden.

Für die klinische als auch paraklinische Erscheinung der Erkrankung gibt der Nachweis des Rheumafaktors einen Anhaltspunkt. Bei Rheumafaktor-positiven Patienten findet man häufiger eine symmetrische Polyarthrititis unter Einbeziehung der kleinen Gelenke, also die klassische Erscheinung der Rheumatoiden Arthritis, weiterhin auch ein größeres Ausmaß der Gelenkschwellung, eine stärker reduzierte Griffstärke und eine ausgeprägtere radiologische Progression. Die Blutsenkungsgeschwindigkeit sowie das C-reaktive Protein erreichen höhere Werte bei positivem Rheumafaktornachweis. (Hein et al. 1993, Papadopoulos et al. 2001) Für einen eher ungünstigen Verlauf sprechen des weiteren ein niedriger sozioökonomischer Status und ein geringeres Bildungsniveau, als auch das genetische Merkmal HLA-DR β 1*0401 bzw. -DR β *0404 (Lipsky 1998).

Die Lebenserwartung von RA-Patienten mit deutlich erhöhter Aktivität ist auch um 3 bis 7 Jahre reduziert (Lipsky 1998). Todesursachen sind häufig Infektionen, gastro-intestinale

Blutungen oder lymphoproliferative Malignome, folglich Ursachen, die im nicht unerheblichem Ausmaß mit der medikamentösen Therapie im Zusammenhang stehen. Das Ausmaß der entzündlichen Aktivität bestimmt auch das Risiko für kardiovaskuläre Komplikationen, einer weiteren häufigen Todesursache. Diese wird durch eine Arteriosklerose mitbedingt. Inwieweit hier AGEs eine Rolle spielen, ist noch nicht hinreichend geklärt. (Wolfe et al. 1994, Wallberg-Jonsson et al. 1999)

Extraartikuläre Komplikationen, wie zum Beispiel eine Lungenfibrose, können ebenfalls die Lebenserwartung der RA-Patienten reduzieren (Gabriel et al. 2003).

Bei einer Spondylarthritis der Halswirbelsäule, aus der eine atlantoaxiale Dislokation resultieren kann, sind chirurgische Maßnahmen lebensrettend. Anderenfalls ist binnen 7 Jahren eine 100% Mortalität zu verzeichnen (Sunahara et al. 1997).

2.1.3 Häufigkeit und Geschlechtsverteilung

Es wird damit gerechnet, dass ungefähr 2-3% der Bevölkerung an einer Rheumatoiden Arthritis leiden (Baenkler 1997). Das typische Manifestationsalter liegt im 4. und 5. Lebensjahrzehnt, wobei die Inzidenz mit steigendem Alter zunimmt (Lipsky 1995). Insgesamt wird mit einem jährlichen Neuauftreten von 50 Fällen je 100.000 Einwohnern gerechnet (Grasedyck 1998). Im Vergleich dazu gibt es Länder mit geringerer Inzidenz, z.B. Frankreich (Guillemin et al. 1994) oder Griechenland (Drosos et al. 1997), aber auch höherer Neuerkrankungsraten, z.B. USA (Gabriel et al. 1999).

Trotz dieser internationalen Inzidenzunterschiede scheint das Geschlechtsverhältnis relativ konstant zu sein. Es erkranken 3-4 mal mehr Frauen als Männer. (Baenkler 1997, Gabriel et al. 1999, Drosos et al. 1997, Guillemin et al. 1994)

2.1.4 Pathogenese der RA

Zur Pathogenese der RA gibt es zwei sich teilweise ergänzende Hypothesen des Initialstadiums, die aber in eine gemeinsame Endstrecke der Krankheitsentwicklung münden. Im Zentrum der ersten Hypothese stehen T-Lymphozyten, die durch ein unbekanntes Antigen MHC-II-abhängig aktiviert werden. Synovioblasten in transformiertem Zustand stellen den Hauptgegenstand der zweiten Hypothese dar. Sie werden aktiviert und proliferieren. Das führt zu einer Knorpel- und Knochendestruktion, wobei aktivierte T-Lymphozyten sekundär mit einbezogen werden.

Zur ersten Hypothese des Initialstadiums:

Da bei Patienten mit RA häufig die Phänotypen HLA-DR4 und HLA-DR1 gefunden werden, wird vermutet, dass die entsprechenden MHC-II-Rezeptoren an der Antigenpräsentation beteiligt sind. Es konnte sogar gezeigt werden, dass hierbei eine bestimmte Aminosäuresequenz in der 3. hypervariablen Region der polymorphen β -Kette dieser beiden MHC-II-Rezeptoren ausschlaggebend und damit RA-prädiponierend ist. (Cairns et al. 1985, Hein et al. 1999a, Geiler et al. 1997, Hein et al. 1995)

Das konkrete Antigen, welches hierbei gebunden wird, ist unbekannt. Die AGEs könnten hier allerdings ein mögliches Neoepitop, also ein neu gebildetes antigen wirkendes Agens darstellen und somit ätiologische Bedeutung erlangen. Bewiesen ist diese Hypothese allerdings nicht.

Folge dieser Präsentation des Antigens ist die klonale Expansion und Aktivierung von CD-4-positiven T-Helferzellen (VanderBorghet et al. 2001), die wiederum über die Produktion proinflammatorischer Zytokine B-Lymphozyten bzw. daraus entstehende Plasmazellen zur Antikörperproduktion anregen. Diese Antikörper reichern sich dann in der Synovia an. Unter anderem kommt es zur lokalen Produktion von Immunglobulin G, welches gegen Kollagen des Typs II gerichtet ist, was zum Beispiel eine Autoimmunhypothese nahelegt (Rönnelid et al. 1994). Immunsuppressive Therapieformen, die unmittelbar auf die Funktion der B-Lymphozyten abzielen, offenbaren auch ein gewisses therapeutisches Potential, wie Studien demonstrieren (Gause und Berek 2001).

Eine weitere Folge dieser proinflammatorischen Zytokine ist die Aktivierung von Makrophagen und Monozyten, deren Effekte in der pathogenetischen Endstrecke zum Tragen kommen (VanderBorghet et al. 2001).

Ein begrenztes Repertoire an T-Zell-Rezeptoren, welches eigentlich zu vermuten wäre, konnte aber bisher nicht eindeutig belegt werden (Goronzy et al. 1994, Hein et al. 1999a, Geiler et al. 1997).

Ein weiterer Widerspruch ergibt sich aus dem Befund, dass die in der Synovia nachgewiesenen T-Lymphozyten einen geringen Aktivierungsgrad zeigten, was anhand der Synovialkonzentration des Transferrins, IL-2-Rezeptors, IL-2, IL-4 oder IFN- γ untersucht wurde (Burmester et al. 1981, Klareskog et al. 1981, Cush und Lipsky 1988, Firestein und Zvaifler 1987, Saxne et al. 1988, Hein et al. 1999a, Geiler et al. 1997). Möglich erscheint auch, dass es sich hierbei um untypische T-Lymphozyten handelt, die ihre Aktivierung und Entwicklung anders als bisher bekannt gestalten (Weyand 2000). Eine weitere Erklärung für diesen Befund könnte der mit der Entzündung zunehmende oxidative Stress sein, der die T-Lymphozyten-

aktivierung hemmt, des weiteren auch der Einfluss von hemmenden Zytokinen, wie zum Beispiel des TGF- β . Folglich ist der Zustand einer erhöhten Aktivierung von CD-4-positiven T-Lymphozyten eher in einem sehr frühen Krankheitsstadium zu vermuten, welches auch präklinisch liegen könnte, also zu einem Zeitpunkt, zu dem der Patient noch keinen Arzt aufsucht.

Da bisher kein Antigen nachgewiesen werden konnte, welches die T-Zellen stimuliert, erscheint auch eine antigenlose Aktivierung möglich. Diese wird auch als „bystander“-Aktivierung bezeichnet und zum Beispiel durch IL-2, IL-6 als auch TNF- α verursacht. Die auf diese Art aktivierten T-Lymphozyten regen wiederum Monozyten zur TNF- α -Produktion an. Es resultiert folglich eine sich selbst verstärkende Stimulationskaskade, der eine Hemmung durch die IL-10-Ekretion, einem potenten endogenen Hemmer der TNF- α -Produktion, fehlt, da diese nicht durch die „bystander“-aktivierten T-Zellen unterstützt wird. Dies führt insgesamt zu einer chronischen Überproduktion von proinflammatorischen Zytokinen. (Unutmaz et al. 1994, Sebbag et al. 1997, Hein et al. 1999a)

Ein weiter Ausgangspunkt für die TNF- α - und IL-6-Entstehung könnte das kürzlich wiederentdeckte proinflammatorische Zytokin HMGB-1, das High-mobility-group-box-chromosomal-Protein 1, sein. Es kommt ursprünglich im Zellkern vor und dient der Stabilisierung der DNA sowie der Beeinflussung der dort ablaufenden Stoffwechselprozesse. Es wurde allerdings auch extranukleär, sogar extrazellulär entdeckt. Es vermittelt seine Wirkung durch Bindung an AGE-Rezeptoren (Andersson et al. 2002). Unter seiner Wirkung produzieren Makrophagen TNF- α , IL-1 β und IL-6. Dies konnte auch explizit für Makrophagen in der Synovia von RA-Patienten nachgewiesen werden (Taniguchi et al. 2003), so dass hier ein pathogenetischer Einfluss nahe liegt.

Die Annahme, dass durch eine T-Lymphozytenhemmung diese Stimulationskaskade durchbrochen werden könnte, hat sich nicht hinreichend bestätigt. Der Einsatz von Antikörpern gegen CD-4, CD-5, CD-7 und CD-w52 als auch von an Diphtherietoxin gekoppelten IL-2 führte zwar zu einer Reduktion der T-Zell-Zahl aber bei unveränderter Aktivität (van der Lubbe et al. 1995, Hein et al. 1999a, Geiler et al. 1997). Verwendet man einen nicht-depletierten monoklonalen CD-4-Antikörper bleibt zwar die Entzündungsaktivität der Erkrankung unbeeinflusst, aber die Produktion von Nicht-T-Zell-Zytokinen ist messbar reduziert. Vielleicht wird es damit möglich sein die Stimulationskaskade zu durchbrechen. (Panayi et al. 2001).

Als weiterer Beleg für diese Hypothese wird oft die klinische Besserung einer RA-Erkrankung bei HIV-Infektion angeführt, also einer Infektion, welche die T-Lymphozyten betrifft.

Dies ist allerdings nicht unwidersprochen, da ein Rückgang der Entzündungsaktivität nicht immer auftritt. Eine Erklärung für diesen Widerspruch wäre, dass das Ausmaß des Einflusses der T-Lymphozyten auf die Pathogenese vom Erkrankungsstadium abhängt. Folglich ist eine Verbesserung nur in T-Zell-abhängigen Phasen zu erwarten. Diese liegen eher am Anfang der Erkrankung einer RA. Dies entspricht auch klinischen Beobachtungen, dass erosive Gelenkveränderungen trotz fortschreitender HIV-Erkrankung, verbunden mit sinkenden T-Lymphozyten-Zahlen, weiter progredient sind. (Müller-Ladner et al. 1995)

Zur zweiten Hypothese des Initialstadiums:

Im Zentrum der anderen Hypothese stehen transformierte Synovioblasten vom Typ B, die eine Hyperplasie zeigen. Als Belege für die Bedeutung der Synovioblasten in der Pathogenese der RA gilt die Beobachtung, dass diese RA-Synovioblasten eine erhöhte Proliferations-tendenz haben, die unabhängig von einem Proliferationsreiz (z.B. Kunststoff oder extrazelluläre Matrix) auftritt (Ponteziere et al. 1990). Auch das invasive Wachstum unterscheidet sie von normalen Zellen der Gelenkinnenhaut.

Proliferationsassoziierte Moleküle sind ebenfalls nachweisbar, unter anderem PCNA/cyclin, c-myc oder nuclear organizer region. Bei den pathologischen Synovioblasten kommt es weiterhin noch zu einer Expression von Onkogenen. Dies ist für die Gene jun-B, c-fos, ras und myc nachgewiesen. (Qu et al. 1994, Hein et al. 1999a, Geiler et al. 1997)

Auch Tumorsuppressorproteine könnten eine Rolle spielen. So wurde eine Mutation und starke Expression des p53-Gen von synovialen Fibroblasten in der Synovia als auch in der synovialen Deckzellschicht gefunden. Das Tumorsuppressorprotein PTEN wird bei RA-Patienten in der oberen synovialen Deckzellschicht geringer exprimiert als in tieferen Schichten oder bei Gesunden insgesamt. Diese Ergebnisse sind allerdings noch nicht allgemein anerkannt. (Seemayer et al. 2001)

Das verstärkte Wachstum wird auch durch eine gestörte Apoptose unterhalten (Pap et al. 2000). Dafür spricht die erhöhte bcl-2-Expression sowie der Nachweis des anti-apoptotischen Moleküls Sentrin in vitro als auch in vivo (Seemayer et al. 2001).

Die transformierten Synovioblasten zeigen einige Parallelen zu malignen Zellen. Bei ihnen liegen ein überschießendes Wachstum, eine fehlende Kontaktinhibition, eine onkogene Aktivierung, eine monoklonale oder oligoklonale Expansion, eine messbare Telomerase-Aktivität sowie somatische Genmutationen vor. Metastasen von Synovioblasten treten aber niemals auf, so dass sie nicht wirklich maligne sind. (Yamanishi und Firestein 2001)

Für die synoviale Destruktion ist die Koexpression von Onkogenen, Transkriptionsfaktoren und Enzymen von entscheidender Bedeutung. Dies konnte für das gemeinsame Auftreten von

c-fos und egr-1 sowie der Kollagenase, dem wichtigsten Destruktionsenzym, und Stromelysin gezeigt werden (Buttice et al. 1991, Trabandt et al. 1992). Ein weiteres Beispiel stellt die Koexpression von ras und Kathepsin-L dar (Lemaire et al. 1994, Solovyeva et al. 1995). Als Ursache für die synovioblastische Transformation werden sowohl eine virale Infektion als auch eine Wirkung proinflammatorischer Zytokine diskutiert. In der Synovia konnten so genannte „virus-like“-Partikel nachgewiesen werden, zum Beispiel das endogene retrovirale Element L1, welches eine Hochregulation weiterer Moleküle zur Folge hat, unter anderem der SAP-Kinase 4, des Met-Protoonkogens und des Galectin-3-Bindungsproteins (Seemayer et al. 2001). Diese „virus-like“-Partikel werden als Hinweis auf eine retrovirale Infektion verstanden, beweisen diese aber nicht. Weiterhin stand noch der Epstein-Barr-Virus in Verdacht. Ein direkter Einfluss auf die Pathogenese scheint aber höchst unwahrscheinlich (Niedobitek et al. 2000). Ähnlich verhält es sich mit einer Parvovirus B-19-Infektion (Ishii et al. 1999). Fibroblasten von RA-Patienten verhalten sich menschlichem Knorpel gegenüber destruktiv, im Vergleich zu Fibroblasten von Gesunden oder Patienten mit einer Arthrose, die keinerlei Destruktionstendenz zeigten. Dies wurde an SCID-Mäusen demonstriert, denen sowohl menschlicher Knorpel als auch Fibroblasten implantiert wurden. (Müller-Ladner et al. 1996) Das zerstörerische Attachement der RA-Synovioblasten wird über verschiedene Adhäsionsmoleküle vermittelt. Unter anderem durch VCAM-1, welches einer Regulation durch TNF- α unterliegt, und Fibronectin-Spleißvariante CS-1. Diese beiden sind für die Bindung von VLA-4 exprimierenden Lymphozyten zuständig, die für die Unterhaltung des Entzündungsprozesses verantwortlich sind. Über andere Integrine heften sich die Synovioblasten vom Typ B an das Fibronectin der Knorpelzellen. Von Bedeutung könnte das in der Synovia nachgewiesene Osteopontin sein, ein extrazelluläres Matrixprotein, welches ursprünglich bei der Anheftung von Tumormetastasen gefunden wurde. (Seemayer et al. 2001)

Auch Neuropeptide, zum Beispiel Substanz P, Neurokinin A, vasoactive-intestinal-peptide (VIP) oder calcitonin-gene-related-peptide (CGRP), aus terminalen C-Fasern können den lokalen Entzündungsprozess, die synoviale Zellproliferation und Kollagenaseexkretion modifizieren (Arnalich et al. 1994, Jorgensen und Sany 1994). Dafür spricht auch das klinische Fallbeispiel eines an AIDS erkrankten RA-Patient bei dem sich eine Hemiparese ausbildete. Nur in den paretischen Extremitäten kam es zu einer kompletten Remission der Arthritis (Lapadula et al. 1997).

Zusammenfassend muss man sagen, dass es bei den RA-Synovioblasten zu einem komplexen Muster molekularer Änderungen kommt und die Zellen nicht nur auf proinflammatorische

Zytokine reagieren. Die Ursache für diese Veränderungen ist bisher noch unklar. (Pap et al. 2000)

Pathogenetische Endstrecke:

Wichtig beim zerstörerischen Verlauf der Rheumatoiden Arthritis sind Kollagenasen und andere Proteinasen. Diese werden durch IL-1, welches von Makrophagen produziert wird, aktiviert. Hierbei ist für den Krankheitsverlauf das Gleichgewicht zwischen IL-1 und IL-1-Ra von Bedeutung. IL-1-Ra ist ein Antagonist am IL-1-Rezeptor und konkurriert mit IL-1 um die Bindung an diesem Rezeptor. Das Fehlen von IL-1-Ra prädisponiert für einen früheren Auftritt der Arthritis und einen schwereren Krankheitsverlauf. (Arend 2001)

Einen weiteren Effekt des IL-1 stellt die Induktion der NO-Synthetase in Makrophagen und Fibroblasten dar. Das Stickstoffmonoxid (NO) wirkt antioxidativ, könnte also eine Rolle bei der Regulation des oxidativen Stresses spielen. Für die Bedeutung des oxidativen Stresses in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis sprechen auch die Befunde am antioxidativ wirkenden Glutathion-System. Hier ist eine Dysfunktion zu verzeichnen, mit einer Begünstigung des oxidativen Stresses (Hassan et al. 2001). Die AGE-modifizierten Proteine führen zu einer akzelerierten Entstehung von oxidativem Stress. Umgekehrt bietet das AGE-Konzept therapeutische Ansätze zur Eindämmung dieses pathologischen Zustandes.

Das TNF- α ist ebenfalls fähig, die Makrophagen und Fibroblasten zur Erzeugung der NO-Synthetase anzuregen, kann aber auch, wie oben erwähnt, VCAM-1 induzieren.

Die Gewebsdestruktion selbst aber auch die Angiogenese, z. B. im Synovioblasten-Proliferat, dem Pannusgewebe, wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren beeinflusst, unter anderem TGF- β , GM-CSF und LIF (Odeh 1997). Das TGF- β stammt, wie das schon weiter oben genannte IL-1, von aktivierten Makrophagen, die durch CD-69-positive-Lymphozyten angeregt wurden. Diese Lymphozyten haben weiterhin noch die Fähigkeit, Synoviozyten direkt zur Produktion von Metalloproteinasen anzuregen (Panayi 1997).

Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung von Makrophagen stellt das IL-15 dar. Es stammt von Synoviozyten-Typ-A, also synovialen Makrophagen. Auch die CD-69-Expression von Synoviozyten wird durch das IL-15 gesteigert, in deren Folge es zu einer antigenunabhängigen T-Lymphozyten-Aktivierung kommen kann (Mc Innes und Liew 1998).

Zusammengefasst spielen in der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis offenbar komplexe Interaktionen von Interleukinen eine wichtige Rolle, wobei sich die Bedeutung der einzelnen Interleukine aktivitäts- und stadienabhängig ändert.

Bezüglich der beiden Hypothesen des Initialstadiums ist zu sagen, dass es sich hierbei nicht unbedingt um zwei konkurrierende, sondern vielmehr um sich ergänzende Theorien handelt.

Im frühen, vielleicht präklinischen Stadium scheint die T-Lymphozyten-Aktivierung vordergründig zu sein, wodurch die Erscheinungen, die Gegenstand der zweiten Hypothese sind, induziert werden. Hierbei erweisen sich sehr wahrscheinlich Infektionen als förderlich, aber nicht zwingend notwendig.

2.1.5 Therapie der RA

Die Therapie der RA ist wie die Krankheit selbst sehr komplex. Um für die Patienten ein maximales Therapieergebnis zu erreichen, ist ein interdisziplinäres Vorgehen unabdingbar. Die Säulen der Therapie bestehen aus der Pharmakotherapie, die sich weitgehend an der Pathogenese orientiert, der orthopädisch-operativen Therapie, der Physiotherapie unter Einschluss der Balneotherapie sowie verschiedener Naturheilverfahren und auch der Psychotherapie.

Das optimale Therapieziel, die Heilung, ist mit unseren heutigen Mitteln in der Regel nicht möglich. Realistisch ist aber eine weitestgehende Suppression der Entzündungsaktivität, die insbesondere am Anfang der Erkrankung den Patienten sehr beeinträchtigt, und damit das Erreichen eines Stillstandes der Progression der Gelenkzerstörung, deren funktionelle Beeinträchtigung das Spätstadium dominiert. Hier wird deutlich, dass eine möglichst frühe und konsequente Therapie dem Patienten ein positives Langzeitergebnis ermöglicht.

Eine kausale Therapie steht derzeit nicht zur Verfügung. Die immunsuppressive und antiproliferative Therapie (z.B. DMARDs, Anti-Zytokin-Therapie, Glucocorticoide) orientiert sich an der oben beschriebenen Pathogenese und wird durch eine symptomatische Therapie ergänzt.

Ein wichtiger Bestandteil der symptomatischen Therapie sind die nichtsteroidalen Antirheumata (NSAR), z.B. Ibuprofen, Diclofenac und Indomethacin. Sie wirken über die Hemmung der Zylooxygenase (COX), einem Enzym der Prostaglandin-Synthese. Die Prostaglandine sind Mediatoren des Entzündungsprozesses (Vane 1971). Diese altbekannten und bewährten Medikamente haben aber den Nachteil, dass sie unselektiv alle Isoformen der COX hemmen. Es hat sich aber gezeigt, dass am Entzündungsgeschehen vor allem die COX-2 beteiligt ist (Fu et al. 1990), die COX-1 aber unter anderem im Magen vorkommt, wo die Prostaglandine einen Mucosa-protectiven Effekt haben. Daraus erklären sich auch die gastrointestinalen Nebenwirkungen in Form von Ulcera. Die neuentwickelten selektiven COX-2-Hemmer, die Coxibe, entschärfen die gastrointestinalen Nebenwirkungen (Stichtenoth et al. 1998), verhindern sie aber nicht völlig (Giap et al. 2002). Die NSAR wirken analgetisch und antiphlogistisch, verhindern aber die Knorpelzerstörung nur in geringem Maße. Sie werden

vorwiegend symptomatisch eingesetzt. Eine Langzeittherapie ist oft notwendig. (Hein et al. 1999b)

Einen weiteren unverzichtbaren Bestandteil der Pharmakotherapie stellen die Glucocortikoide dar. Sie zeichnen sich durch ihre äußerst schnelle und effektive Wirksamkeit aus und machen sie zum Mittel der Wahl um einen akuten Schub zu terminieren. Wegen ihrer langfristigen Nebenwirkungen, unter anderem die Entstehung einer schweren Osteoporose, die Prädisposition zur Entwicklung eines Ulcus ventriculi, eine prädiabetische Stoffwechsellaage und die Gefahr opportunistischer Infektionen, sollte nur eine zeitlich begrenzte Therapie angestrebt werden. Oft sind aber Glucocortikoide in niedriger Dosierung nötig. Sie wirken immunsuppressiv und antiphlogistisch. Auch bei einer Low-dose-Therapie konnte ein protektiver Effekt auf die radiologische Progression nachgewiesen werden (Kirwan 1995, Kirwan und Kim 1996).

Molekularbiologischer Hintergrund der Wirksamkeit ist eine Hemmung von Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel des NF κ B, wodurch die Expression proinflammatorischer Zytokine vermindert wird. Auch ein posttranslationales „Processing“ der mRNA von IL-1, IL-2, IL-6 und TNF- α ist hierbei beteiligt. (Bamberger und Schulte 1997)

Die DMARDs (disease modifying antirheumatic drugs) stellen eine Gruppe von Medikamenten dar, deren Kennzeichen der verzögerte Wirkungseintritt ist. Ihre Wirksamkeit lässt sich erst nach Wochen, teilweise sogar Monaten sicher beurteilen. Damit sind sie natürlich für die Therapie des akuten Schubes nicht geeignet, können aber den Entzündungsprozess in Remission bringen und auch halten, wodurch die Progression der Gelenkzerstörung aufgehalten wird. Sie wirken antiproliferativ und antiresorptiv, teilweise aber auch immunmodulierend und antiphlogistisch. (Hein et al. 1999b)

Vertreter dieser inhomogenen Gruppe, deren Kombination auch sinnvoll sein kann, sollen im Folgenden kurz genannt werden.

Relativ milde Medikamente mit weniger schwerwiegenden Nebenwirkungen sind das Sulfasalazin und die Antimalariamittel Chloroquin bzw. Hydroxychloroquin. Als sehr wirksam auch bei aktiven und progredienten Fällen, aber mit mehr Nebenwirkungen haben sich das Methotrexat, Leflunomid, Azathioprin, Cyclophosphamid, der spezifische T-Lymphozytenhemmer Cyclosporin A und Goldsalze erwiesen.

Bei einer Kombination von Methotrexat mit Cyclosporin A konnte beispielsweise gefunden werden, dass die TNF- α -Spiegel niedriger sind als bei einer Monotherapie. Allerdings ist der TNF- α -mRNA-Spiegel gleich (Giacomelli et al. 2002). Hieran zeigt sich, dass eine Kombination von DMARDs deren Effektivität steigern kann.

Eine Studie über den Einsatz von DMARDs in Tschechien und der Slowakei hat gezeigt, dass es zu Therapieabbrüchen bzw. -umstellungen wegen fehlender Wirksamkeit und intolerablen Nebenwirkungen kommt, wobei die Häufigkeit für beide Gründe annähernd gleich ist (Pavelka et al. 2002). Die mit Abstand beste Verträglichkeit sowie Wirksamkeit und damit längste Therapiedauer zeigt das Methotrexat, die höchste Abbruchrate ist für die orale Goldtherapie zu verzeichnen. Hydroxychloroquin, Penicillamin, parenterales Gold und Azathioprin weisen eine vergleichbare durchschnittliche Therapiedauer auf (Pincus et al. 1992).

Eine sehr moderne Therapieform stellt die Blockierung proinflammatorischer Zytokine dar. Für die Hemmung des TNF konnte gezeigt werden, dass es das gestörte Apoptoseverhalten an verschiedenen Stellen beeinflusst (Wollheim 2002). Es gibt TNF-Antikörper (z.B. Infliximab, Adalimumab) und auch TNF-Rezeptor-Fusionsproteine (z.B. Etanercept). Sie sollen die Wirkung des TNF neutralisieren. Ihre klinische Wirkung konnten sie schon unter Beweis stellen (Elliot et al. 1993, Moreland et al. 1997, Weaver 2004, Moreland 2004, Hansen et al. 2004), allerdings ist ihr Langzeiteffekt noch nicht klar. Für Etanercept wurde gezeigt, dass es verschiedene Metalloproteinasen, für die Knorpel- und Knochenzerstörung wichtige Enzyme, down-regulieren kann (Catrina et al. 2002). Hiermit ist auch eine „pathogenetische“ Wirkung demonstriert.

Untersucht werden auch Kombinationen mit DMARDs. Gute synergistische Effekte konnten für Methotrexat kombiniert mit Infliximab gezeigt werden (Maini et al. 1998). Eine Kombination von Etanercept mit Leflunomid zeigte zwar eine verbesserte Wirksamkeit im Vergleich zur Monotherapie, aber auch erhebliche Nebenwirkungen, z.B. an der Haut bis hin zum Stevens-Johnson-Syndrom, was die klinische Einsetzbarkeit beschränkt (Kiely und Johnson 2002).

Auch der Einsatz von IL-1-Rezeptorantagonisten (z.B. Anakinra) zeigt gute Wirkung auf die Entzündungsaktivität sowie Progression der Gelenkzerstörung (Bresnihan et al. 1996, Bresnihan et al. 1998).

Die Gentherapie stellt einen weiteren Therapieansatz dar. Es wird versucht Anti-Arthritis-Gene in Gelenke zu injizieren. In tierexperimentellen Studien konnte die Wirksamkeit für dieses Therapieverfahren gezeigt werden. Am Menschen wurde dies mit dem IL-1-Rezeptor-Antagonisten-Gen versucht, welches in die Metacarpophalangealgelenke von RA-Patienten injiziert wurde. Die Erfahrungen mit diesem Verfahren stehen aber erst am Anfang. (Gouze et al. 2001)

Auch die Leukozytenapherese wurde zur Therapie der RA eingesetzt. Hierdurch konnten die Enzymaktivitäten der Granulozyten gesenkt werden. Auch das klinische Befinden der Patienten konnte durch diese Therapie verbessert werden. (Yamasaki et al. 2002)

Bei Patienten mit einer sehr fortgeschrittenen RA konnte mittels Immunadsorption unter Beteiligung des Staphylokokken-Proteins A eine Beschwerdelinderung erreicht werden (Hailey und Topfer 2002, Bosch 2003). Im Zusammenhang mit dieser Therapie wurde aber auch auf die Gefahr einer sekundären Vaskulitis mit einer Glomerulonephritis hingewiesen. Diese wird durch die Ablagerung von Immunkomplexen aus Staphylokokken-Protein A und dessen Antikörpern verursacht (Deodhar et al. 2002).

Erforscht wird zur Zeit auch der therapeutische Effekt von Angiognese-Hemmern, z.B. Endostatin. Hier liegen allerdings nur tierexperimentelle Erfahrungen mit SCID-Mäusen vor, denen Pannusgewebe von RA-Patienten implantiert wurde. Es konnte aber eine Regression des Pannusgewebes und reduzierte Entzündungsaktivität durch Angiogenese-Hemmer induziert werden. (Matsuno et al. 2002)

2.2 AGEs

2.2.1 Begriffserklärung

Die Abkürzung AGEs steht für „advanced glycation endproducts“. Das besondere hierbei ist, dass die entscheidenden Reaktionen ohne Beteiligung von Enzymen ablaufen (Nawroth et al 1999, Brownlee et al. 1988). Daher lautet die deutsche Entsprechung dieses Begriffs „nicht-enzymatische Glycierung“. Diese Glycierung kann Proteine, aber auch Phospholipide und Nukleinsäuren betreffen, woraus ein verändertes biologisches Verhalten resultiert (Nawroth et al. 1999, Bucala et al. 1993, Bucala et al. 1994, Bucala et al. 1984, Gugliucci und Bendayan 1995, Vlassara 1996). Im Folgenden werden nur Proteine betrachtet. Man nennt die Reaktionskette, an deren Ende die AGEs entstehen, auch Maillard-Reaktion oder Bräunungsreaktion.

2.2.2 Biochemie der AGEs

Am Ausgangspunkt der Entstehung reagieren reduzierende Zucker, also Polyalkohol-Aldehyde bzw. -Ketone mit den Aminogruppen der Proteine. Es entstehen Aldimine, die so genannten Schiffsbasen, die sich wiederum in 1-Aminodesoxyketosen, Amadori-Produkte umwandeln. Diese Amadori-Produkte können sich dann nach Oxidations- und Eliminationsreaktionen durch Kondensation quervernetzen, das heißt, dass auch die beteiligten Proteine quervernetzt sind. Es haben sich Cross-links gebildet. Diese Quer-

vernetzungsreaktion ist im Unterschied zu den vorher erwähnten Reaktionen irreversibel (Bierhaus et al. 1998) (Abb. 2.1).

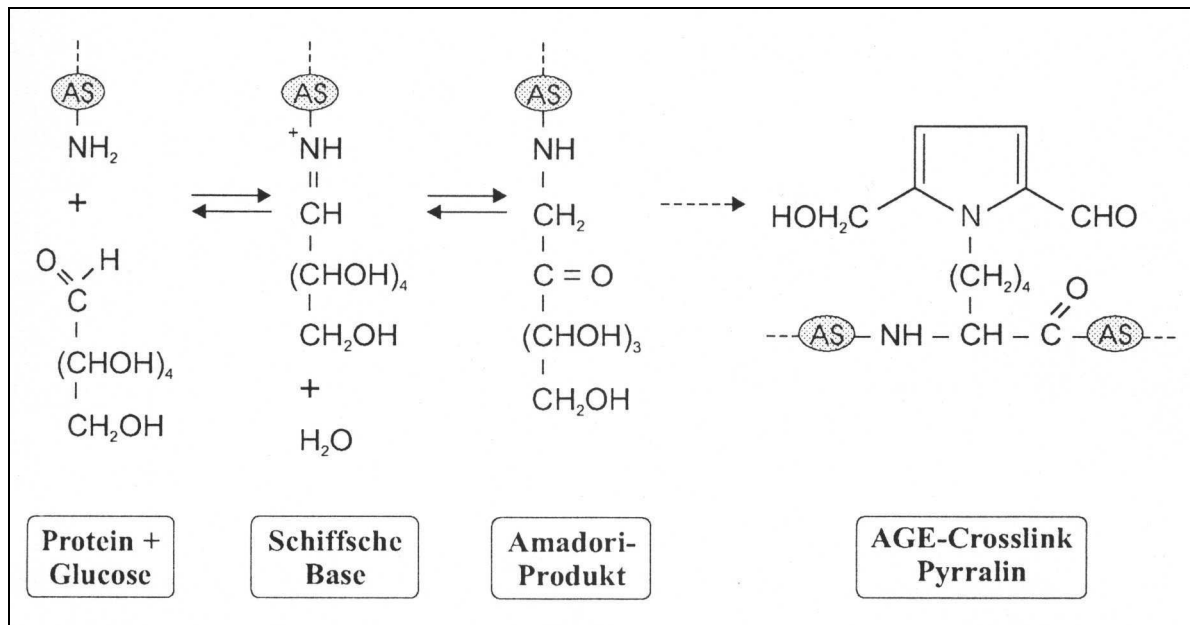


Abb. 2.1 Reaktionsfolge zur Bildung von AGEs

Übergangsmetalle, wie zum Beispiel Kupfer oder Eisen, begünstigen die Oxidation der Amadori-Produkte und damit auch die Entstehung von AGE-modifizierten Proteinen (Nawroth et al. 1999).

Die Glycierungsrate ist abhängig vom beteiligten Zucker und von der verstrichenen Zeit (Wisotzky et al. 1996). Glucose reagiert verhältnismäßig träge. Höhere Glycierungsraten weisen hingegen intrazelluläre Zucker, wie zum Beispiel Fructose, Glucose-6-Phosphat, Glyceraldehyd oder Glycolaldehyd, auf (Bann und Higgins 1981, Suarez et al. 1989). Die Entstehung von reaktiven Dicarboxylintermediaten (z.B. Arabinose, Methylglyoxal oder Glyoxal) beschleunigt die Maillard-Reaktion (Wells-Knecht et al. 1995). Diese Zwischenprodukte können durch Metall-katalysierte Autooxidation von Glucose entstehen.

Bei dieser Reaktion entstehen Superoxidradikale. Das Gewebe wird einem oxidativen Stress ausgesetzt (Hunt et al. 1988).

AGE-modifizierte Proteine binden an Rezeptoren auf Makrophagen. Nach lysosomaler Verstoffwechselung entlassen diese Zellen lösliche AGEs, welche zirkulieren und renal ausgeschieden werden (Nawroth et al. 1999, Vlassara et al. 1985, Makita et al. 1994).

Folglich ist bei einer Niereninsuffizienz mit einer Akkumulation zu rechnen (Wisotzky et al. 1996).

et al. 1991, Neeper et al. 1992, Schmidt et al. 1994a, Schmidt et al. 1994b, Schmidt et al. 1992, Li et al. 1995, Krantz et al. 1995, Takata et al. 1989, Nawroth et al. 1999)

Die Folgen des durch AGE-RAGE-Interaktion hervorgerufenen intrazellulären oxidativen Stresses ist eine erhöhte Expression der Gene für verschiedene Zytokine, Adhäsionsmoleküle, Rezeptoren für Gerinnungsfaktoren und Endothelin-1. All diese immunologischen Botenstoffe sind wichtige Faktoren verschiedener chronischer Krankheiten, wie zum Beispiel der RA. Vermittelt wird diese „proinflammatorische“ Genexpression durch den Transkriptionsfaktor NFκB, der durch Degradation seines Inhibitors IκB seine Aktivität steigern kann. (Nawroth et al. 1999, Baeuerle und Baltimore 1996)

NFκB ist einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren zur Genregulation von Zytokinen und anderen proinflammatorischen Proteinen. Über ihn erklärt sich auch die Wirkung der lange bekannten und bewährten Glucocorticoide zur Therapie entzündlicher Erkrankungen (Bamberger und Schulte 1997, Auphan et al. 1995, Scheinman et al. 1995). Die AGEs wirken also über einen sehr zentralen Mechanismus der Entzündungsinduktion.

Auch verschiedene Zytokine führen zu einer NFκB-Aktivierung. Der entscheidende Unterschied ist aber, dass AGEs zu einer langanhaltenden Aktivierung führen. Verursacht wird diese langanhaltende Aktivierung durch eine gesteigerte RAGE-Expression. (Nawroth et al. 1999, Abel et al. 1995, Ritthaler et al. 1995)

Die AGE-Bildungsrate wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Extrazellulär führt das Vorhandensein von Reduktasen, die reaktive Dicarbonylintermediate deaktivieren, zu einer geringeren Produktion (Baeuerle und Baltimore 1996). Möglicherweise ist die Aktivität dieser Reduktasen genetisch determiniert. Folglich gibt es auch Patienten, die mehr oder weniger gut oxidativen Stress kompensieren können (Nawroth et al. 1999).

Intrazelluläre Zucker haben generell eine höhere Glycierungstendenz (Monnier 1988). So werden auch intrazelluläre detoxifizierende Reduktasen glyciert und büßen dadurch ihre Aktivität ein (Nawroth et al. 1999). Glycierung des Basic-fibroblast-growth-Factors führt zu einer reduzierten Mitoseaktivität. Der Organismus kann weniger gut Schädigungen, z.B. auch durch AGEs, kompensieren (Giardino et al. 1994, Nawroth et al. 1999).

Oxidativer Stress wird durch das Protoonkogen bcl-2 bzw. dessen Protein bcl X_L gesteuert. Dieses Protein hemmt das NFκB. Dadurch wird der Selbstverstärkungsmechanismus, den die AGEs in Gang setzen, durchbrochen (Nawroth et al. 1999, Giardino et al. 1996, Grimm et al. 1996). Die Auswirkungen der AGEs werden auch durch deren Abbau begrenzt. Dies geschieht durch Phagozytose der Monozyten bzw. Makrophagen (Nawroth et al. 1999, Takata et al. 1988, Vlassara et al. 1986).

Es gibt auch schon Ansätze zur therapeutischen Nutzung des AGE-Konzeptes. Erfahrungen existieren hauptsächlich bei der Therapie bzw. Prophylaxe von diabetischen Folgeerkrankungen, teilweise aber nur in tierexperimentellen Studien (Baynes 1991, Giugliano et al. 1996). Da auch bei der RA oxidativer Stress von entscheidender Bedeutung ist, sind auch hier therapeutische Beeinflussungen denkbar.

Eine Möglichkeit, die AGE-bedingten Effekte zu verhindern, ist die Hemmung der AGE-Bildung selbst. Dies ist durch Antioxidantien oder Aminoguanidin möglich. Das Aminoguanidin reagiert mit der terminalen Aminogruppe und verhindert dadurch die Quervernetzung (Nawroth et al. 1999, Edelstein und Brownlee 1992, Ou und Wolff 1993). Auch Cross-link-Breaker, wie zum Beispiel N-Phenacylthiazolbromid stellen einen sinnvollen Therapieansatz dar (Nawroth et al. 1999, Vasan et al. 1996). Lösliche RAGE könnten mit den membrangebundenen RAGE um die Bindung der zirkulierenden AGEs konkurrieren und dadurch die wirksame AGE-Menge reduzieren (Nawroth et al. 1999, Wautier et al. 1996). Auch NF κ B bietet einen therapeutischen Ansatz. Durch posttranslationale Modifikation kann die Aktivität des Transkriptionsfaktors beeinflusst werden (Nawroth et al. 1999). Des weiteren vermindern NF κ B-affine Oligonukletide kompetitiv die Konzentration des wirksamen NF κ B (Tomita et al. 2000).

2.2.4 Vorkommen von AGEs

AGEs akkumulieren beim normalen Alterungsprozess (Baynes 2001). Da AGEs renal ausgeschieden werden, akkumulieren sie in extremer Weise bei einer Urämie (Haley und Ward 1986, Makita et al. 1991, Wisotzky et al. 1996). So wurde bei dialysepflichtigen niereninsuffizienten Patienten mit Carpaltunnel-Syndrom im Carpalband ein höherer Gehalt an Pentosidin gefunden als bei Patienten mit idiopathischen Carpaltunnel-Syndrom. Hier könnte also das Pentosidin eine pathogenetische Rolle spielen. (Takahashi et al. 1998)

Die Hämodialyse-assoziierte Amyloidose stellt eine Komplikation der Langzeitdialyse dar und betrifft vordergründig die Gelenke und Knochen. In der Pathogenese scheint das AGE-modifizierte β_2 -Mikroglobulin von Bedeutung zu sein, wenngleich der exakte Mechanismus noch unbekannt und umstritten ist (Miyata et al. 1994, Miyata et al. 1996a, Miyata et al. 1996b, Moe et al. 2000, Jaradat et al. 2001).

Diabetes mellitus stellt eine weitere Erkrankung dar, bei der AGEs nachgewiesen wurden und im Zusammenhang mit vielfältigen Komplikationen stehen (Wisotzky et al. 1996; Vlassara et al. 1994, Smulders et al. 1998, Daimon et al. 1999, Knecht et al. 1991, Schleicher et al. 1997).

So wurde gezeigt, dass AGE-modifiziertes Kollagen zur Pathogenese der diabetischen Nephropathie beiträgt (Makino et al. 1996, Friedman 1999a).

Gefäßkomplikationen, zum Beispiel Myokardinfarkt, Apoplex oder peripher-arterielle Verschlusskrankheit als Folge einer Arteriosklerose, sind nicht nur bei Diabetes mellitus mit AGEs assoziiert. Hierbei wird der Effekt über RAGE vermittelt (Hori et al. 1996, Basta et al. 2002). Auch das AGE-modifizierte LDL mit einem erhöhten atherogenen Potential ist von Bedeutung (Makita et al. 1996). Tierexperimentell wurde eine durch AGEs verursachte zunehmende Steifheit der Myokards nachgewiesen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass AGEs für eine mit dem Alter zunehmende Herzinsuffizienz mit verantwortlich sind (Asif et al. 2000).

AGEs spielen weiterhin eine Rolle bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen. So wurden in den senilen Plaques beim Morbus Alzheimer AGEs nachgewiesen (Colaco et al. 1996). Relevante Mengen AGEs finden sich aber auch im Liquor von Patienten mit Morbus Alzheimer sowie vasculärer Demenz (Bar et al. 2003). Beim Morbus Parkinson scheinen AGEs und oxidativer Stress ebenfalls von Bedeutung zu sein (Castellani et al. 1996).

Wie in vielen Studien gezeigt wurde, verursacht AGE-modifiziertes Kollagen im Knorpel weitreichende Veränderungen der physikalischen Eigenschaften, wie Elastizität, Dehnbarkeit, Festigkeit, Sprödigkeit (Verzijl et al. 2002, DeGroot et al. 2001, DeGroot et al. 1999, Gibson et al. 2001, Schwab et al. 2002). Neben diesen Veränderungen der mechanischen Eigenschaften des Knorpels beeinflussen die AGEs auch biochemische Prozesse. So kommt es zu einem erhöhten chondrozytären Proteoglycan-Abbau, gleichzeitig aber auch zu einer verminderten Neusynthese. Die Extrazellulärmatrix ist zusätzlich anfälliger gegen einen Abbau durch Metalloproteinase (Saudek und Kay 2003). Hieraus ergibt sich ein multifaktorieller Einfluss auf die Pathogenese der Arthrose.

Weiterhin ist auch AGE-modifizierter Knochen für Osteoklasten besonders attraktiv, was zu einer gesteigerten Resorption führt (Miyata et al. 1997a, Miyata et al. 1996c). In der Pathogenese der Osteoporose sind sowohl die Knochenresorption als auch die Knochenbildung, zusammen als Remodelling bezeichnet, von Bedeutung. Anhand histomorphologischer Parameter konnte gezeigt werden, dass Pentosidin über eine Aktivierung der Osteoklasten die Knochenresorption fördert. Infolgedessen kommt es auch zu einer erhöhten Osteoblasten-Aktivität, also zu einer vermehrten Knochenbildung. Ob auch hierbei Pentosidin beteiligt ist, bleibt noch unklar. CML korreliert negativ mit einem histomorphologischen Abbaumarker. Hier liegt der Verdacht nahe, dass dieses AGE die Osteoklasten-Aktivität hemmt. (Hein et al. 2003)

All diese Befunde, die bei Patienten mit einer Osteoporose erhoben wurden, verdeutlichen den Einfluss der AGEs auf die Pathogenese der Osteoporose. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch experimentelle Befunde. So konnte auf Osteoblasten-ähnlichen Kulturzellen RAGE nachgewiesen werden (McCarthy et al. 1999). Solche Zellen zeigen unter Einfluss von AGE-modifizierten Rinder-Albumin eine reduzierte Synthese von Kollagen Typ I sowie Osteocalcin (Yamamoto et al. 2001). Weiterhin wird die Proliferation und Differenzierung durch AGE-modifiziertes Kollagen beeinflusst (McCarthy et al. 2001).

Bei Patienten mit Fibromyalgie wurden erhöhte Pentosidin-Spiegel gefunden, was ebenfalls ein Hinweis für die pathogenetische Bedeutung bei dieser Erkrankung sein könnte (Hein und Franke 2002).

Der Nachweis bedeutender Konzentrationen an AGEs gelang auch am Auge. Hier werden die AGEs sowohl mit der Katarakt (Argirova und Breipohl 2002, Ahmed et al. 1997) als auch mit dem Keratokonus (Dawczynski et al. 2002) in Zusammenhang gebracht.

2.3 Rheumatoide Arthritis und AGEs

2.3.1 Spiegelvergleiche

Es existieren einige Arbeiten, die sich mit dem Vergleich der AGE-Spiegel, hier insbesondere der Pentosidin-Spiegel, bei verschiedenen Erkrankungen beschäftigen. Es wurden unterschiedliche Körperflüssigkeiten untersucht, Serum, Plasma, Synovia und Urin.

Takahashi fand 1997 (Takahashi et al. 1997) bei RA-Patienten ein im Serum und im Urin signifikant erhöhten Pentosidin-Spiegel im Vergleich zu gesunden Personen. Der Serum-Pentosidin-Spiegel korrelierte positiv mit dem Urin-Pentosidin-Spiegel. Dies ließ sich aber nur bei den RA-Patienten nachweisen. Des weiteren bestand eine signifikante positive Korrelation zwischen dem Serum- als auch Urin-Pentosidin mit dem Alter der RA-Patienten, nicht aber mit der Krankheitsdauer.

Bei der Untersuchung des Zusammenhangs mit der Schwere der Erkrankung nutzte Takahashi die röntgenologische als auch funktionelle Einteilung nach Steinbroker. Bei der röntgenologischen Gradeinteilung zeigen sich die Pentosidin-Spiegel im Grad II und III erhöht gegenüber I und IV. Signifikant waren allerdings diese Unterschiede nicht. Bei der funktionellen Gradeinteilung stiegen die Pentosidin-Spiegel vom Grad I bis III an. Diese Unterschiede waren auch statistisch signifikant. Grad-IV-Patienten konnten wegen fehlender Probanden nicht berücksichtigt werden. Bei der Schweregraduntersuchung wurde auf Altersgleichheit besonderer Wert gelegt.

Signifikante positive Korrelationen fanden sich auch zwischen den Pentosidin-Spiegeln und dem C-reaktiven Protein, Rheumafaktor, Gelenkstatus als auch der Morgensteifigkeit. Für die Blutsenkungsgeschwindigkeit ließ sich dies nur für das Serum-Pentosidin nachweisen. Alle hier ermittelten Korrelationsfaktoren lagen unter 0,5, so dass das Patientenkollektiv noch in 4 Quartile geteilt wurde. Beim Vergleich des I. und IV. Quartils waren nur noch für den Rheumafaktor und die Morgensteifigkeit signifikante Unterschiede bezüglich des Serum- und Urin-Pentosidins nachweisbar.

Patienten, die Steroide zur Therapie benötigten, wiesen signifikant höhere Pentosidin-Spiegel auf als Patienten, die keine Steroide brauchten.

Im Jahre 1998 veröffentlichte Miyata eine weitere Arbeit zu dieser Problematik (Miyata et al. 1998). Er untersuchte die Plasma-Spiegel von Patienten mit Rheumatoider Arthritis, Arthrose, Diabetes mellitus sowie gesunder Vergleichsprobanden. Hier wiesen die RA-Patienten gegenüber allen anderen Gruppen signifikant erhöhte Pentosidin-Spiegel im Plasma auf. Es bestanden hinsichtlich des Alters, der Nierenfunktion und des Stoffwechselzustandes (mit Ausnahme der Diabetes-mellitus-Gruppe) keine Unterschiede. Auch bei den Synovia-Pentosidin-Spiegeln zeigten die RA-Patienten signifikant erhöhte Werte im Vergleich zu den Arthrose-Patienten.

Der Autor sah den Pentosidin-Spiegel als Marker für chronische Entzündungen. Um diese Hypothese zu untermauern, verglich er die Plasma-Spiegel von Patienten, die an einem akuten respiratorischen Infekt erkrankt waren, mit denen Gesunder. Hier fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

Bei der Untersuchung der Entzündungsparameter im Vergleich zum Plasma-Pentosidin, fanden sich signifikante positive Korrelationen zum C-reaktiven Protein, der Blutsenkungsgeschwindigkeit, der Leukozytenzahl und der Thrombozytenzahl.

Im Unterschied zu den Arbeiten von Takahashi fand Miyata keinen Einfluss des Steroidgebrauchs auf den Pentosidin-Spiegel.

Auch eine spanische Arbeitsgruppe, der Rodriguez-Garcia angehört hat, beschäftigte sich mit diesem Thema und veröffentlichte 1998 ihre Ergebnisse (Rodriguez-Garcia et al. 1998). Sie wiesen nach, dass bei RA-Patienten signifikant erhöhte Serum-Pentosidin-Spiegel im Vergleich zu gesunden Probanden vorhanden waren. Auch Diabetiker hatten signifikant erhöhte Spiegel im Serum bezogen auf die Gesunden. Rodriguez-Garcia untersuchte weiterhin Patienten, die an einem systemischen Lupus erythematoses litten. Sie wiesen bezogen auf die Gesunden keinen statistisch sicheren Unterschied bezüglich des Pentosidin-Spiegels auf.

Bei der Verteilung der Messwerte des Pentosidins fiel auf, dass es viele Patienten gibt, die nur leicht erhöhte Spiegel aufwiesen, und einige mit sehr hohen. Daraus resultierte eine sehr weite Standardabweichung.

Bei den Gesunden korrelierte der Pentosidin-Spiegel mit dem Alter. Dies war bei den RA-Patienten und bei den SLE-Patienten nicht der Fall. Über Beziehungen der Pentosidin-Spiegel zur Entzündungssymptomatik traf der Autor keine Aussagen.

Chen veröffentlichte im Jahre 1998 Ergebnisse über die Untersuchung von Synovialflüssigkeit (Chen et al. 1998). Er fand bei RA-Patienten erhöhte Pentosidin-Spiegel im Vergleich zu Arthrose-Patienten. Dieser Unterschied war aber nicht signifikant. Im Zusammenhang mit der Krankheitsaktivität fand der Autor signifikante positive Korrelationen zwischen dem Synovial-Pentosidin auf der einen Seite und dem C-reaktiven Protein, der Blutsenkungsgeschwindigkeit und der Morgensteifigkeit, gemessen durch den Lansbury-Index, auf der anderen Seite. RA-Patienten in einer Gruppe hoher Krankheitsaktivität, das heißt mit einem C-reaktiven Protein größer oder gleich 20 mg/l und einem Lansbury-Index von größer oder gleich 50%, wiesen signifikant höhere Pentosidin-Spiegel in der Synovia auf als Patienten mit einer niedrigen Krankheitsaktivität, die ein C-reaktives Protein von kleiner 20 mg/l und/oder einen Lansbury-Index von kleiner als 50% hatten.

In einer 1999 vom selben Autor veröffentlichten Studie (Chen et al. 1999) konnten bei RA-Patienten signifikant erhöhte Pentosidin-Spiegel im Serum und in der Synovia im Vergleich zu Arthrose-Patienten nachgewiesen werden. Bezüglich der Urin-Pentosidin-Spiegel war der Unterschied aber nicht signifikant. Die Serum-, Synovia- und Urin-Pentosidin-Spiegel korrelierten positiv und signifikant untereinander sowohl bei den RA- als auch bei den Arthrose-Patienten.

Die Serum-Spiegel lagen im Allgemeinen über den Synovia-Spiegeln. Der Unterschied war aber nicht statistisch sicher. Dies traf für beide Erkrankungsarten zu.

Bei den Patienten, die an einer Rheumatoiden Arthritis erkrankt waren, korrelierten positiv das Serum- und auch das Synovia-Pentosidin mit dem C-reaktiven Protein, der Blutsenkungsgeschwindigkeit und dem Lansbury-Index. Für die Urin-Pentosidin-Spiegel ließen sich diese Beziehungen nicht nachweisen.

Auch bei dieser Arbeit teilte Chen die RA-Patienten in zwei Aktivitätsgruppen ein. Zur Gruppe mit hoher Aktivität zählten die Patienten, die ein C-reaktives Protein von 20 mg/l oder darüber und einen Lansbury-Index von größer oder gleich 40% aufwiesen. Dementsprechend rekrutierte sich die Gruppe mit niedriger Aktivität aus den Patienten, die ein C-reaktives Protein von kleiner als 20 mg/l und/oder einen Lansbury-Index von kleiner als 40% hatten.

Diese Einteilung zielte auf einen Unterschied in der akuten Symptomatik ab. Hier zeigten die RA-Patienten mit hoher Krankheitsaktivität signifikant höhere Pentosidin-Spiegel im Serum und in der Synovia als die niedrigaktiven Patienten. Für den Urin ließen sich keine statistisch sicheren Aussagen treffen.

Verglichen wurden die Patienten, die der funktionellen und auch röntgenologischen Einteilung nach Steinbrocker Grad I und II entsprachen, mit den Patienten, die dem Grad III und IV angehörten. Hier fanden sich in allen Körperflüssigkeiten keinerlei signifikante Unterschiede.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Pentosidin-Spiegel bei RA-Patienten in allen verfügbaren Körperflüssigkeiten erhöht ist gegenüber gesunden Vergleichspersonen, Arthrose-Patienten und Diabetes-mellitus-Patienten. Die Serum-Spiegel liegen über dem Niveau der Synovia-Spiegel. Die Pentosidin-Spiegel in verschiedenen Körperflüssigkeiten korrelieren positiv untereinander. Des weiteren wurde ein Zusammenhang mit der aktuellen Erkrankungsaktivität hergestellt. Das Pentosidin als Marker für chronische Entzündungen wurde ebenfalls diskutiert. Mit zunehmender Krankheitsprogredienz, also einer Betrachtung des chronischen Zustands, stieg teilweise der Pentosidin-Spiegel an, wobei im Endstadium Ausnahmen von dieser Tendenz bestanden.

2.3.2 Lokalisation von CML

CML fand sich gehäuft an der synovialen Grenzfläche und darunter, des weiteren am Gefäßendothel. Dies traf für RA-Patienten als auch für Arthrose-Patienten zu, wobei sich aber bei RA-Patienten wesentlich mehr CML fand als bei Arthrose-Patienten. Bei Gesunden ließ sich CML nur an Gefäßendothelien nachweisen. Bei RA-Patienten konnte man CML in Makrophagen und T-Lymphozyten lokalisieren. Die B-Lymphozyten waren hingegen CML-negativ. (Drinda et al. 2001)

Zusätzlich fand Schwab eine CML-Anreicherung im Zytoplasma von Chondrozyten bei Arthrose-Patienten. Bei Gesunden und Arthrose-Patienten fand sich CML in der oberflächlichen Extrazellulärmatrix. Schwab untersuchte allerdings nur den Knorpel von Gesunden und von Arthrose-Patienten. (Schwab et al. 2002)

2.3.3 Bedeutung der AGE-modifizierten Immunglobuline-G und deren Antikörper

Eine Arbeitsgruppe um Newkirk beschäftigte sich mit der Bedeutung der AGE-modifizierten Immunglobuline der Gruppe G (IgG-AGE) und deren Antikörperreaktion. Im Vergleich zu Diabetikern und gesunden Vergleichspersonen fand sich IgG-AGE signifikant erhöht bei RA-

Patienten. Es wurden Antikörper der Klassen IgM und IgA gebildet. Das IgG-AGE und mehr noch deren Antikörperbildung prädisponieren zu einem schwereren Krankheitsverlauf der RA. (Newkirk et al. 1998)

Die IgM-anti-IgG-AGE-Bildung war stark assoziiert mit der Ausbildung von Rheumafaktoren. Diese sind aber nicht identisch (Ligier et al. 1998). Es fanden sich auch signifikante Korrelationen zwischen der klinischen Krankheitsaktivität und dem IgM-anti-IgG-AGE, so dass diese Antikörper als neuer Aktivitätsmarker diskutiert wurden (Lucey et al. 2000).

Auch bei früher Synovitis fand sich bei verschiedenen Arthritis-Formen IgG-AGE, was auch mit einer erhöhten Entzündungsaktivität einherging, aber unabhängig vom Glucose-Spiegel war. Eine bleibende Serokonversion mit der Bildung von IgM-Antikörpern trat nur bei Rheumafaktor-positiven RA-Patienten auf und war mit einer höheren Krankheitsaktivität vergesellschaftet. Bei anderen Arthritis-Formen war die Antikörperreaktion nur passager. (Newkirk et al. 2003)

Die oben geschilderten Befunde sprechen für einen Einfluss der Antikörper gegen AGE-modifizierte Immunglobuline in der Pathogenese der RA. Durch diese Antikörper wird die Clearance der IgG-AGE behindert, was zu einer Verschlimmerung der RA führt. (Tai und Newkirk 2000)

3 ZIELE DER ARBEIT

Die AGE-modifizierten Proteine führen zu einem erhöhten extrazellulären oxidativen Stress und induzieren indirekt zusätzlich eine erhöhte Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine durch eine langanhaltende Aktivierung der RAGE. Des weiteren stellen AGEs mögliche Neoepitope dar, so dass hier auch eine ätiologische Bedeutung möglich erscheint.

Mit der vorliegenden Arbeit soll die pathogenetische Bedeutung der AGEs anhand des Pentosidins und CMLs bei der RA einer Klärung zugeführt werden.

Im Sinne eines zunächst deskriptiven Ansatzes soll in vorliegender Arbeit untersucht werden:

1. Wie verhält sich der durchschnittlich erreichte Serum- und Synovia-AGE-Spiegel von RA-Patienten im Vergleich zu anderen Gelenkerkrankungen, hier am Beispiel der Arthrose und SpA untersucht, aber auch zu gesunden Vergleichsprobanden?
2. Gibt es Unterschiede der AGE-Spiegel im Serum und Synovia bei RA-Patienten?
3. Unterscheiden sich die AGE-Spiegel bei Arthrose und SpA von denen gesunder Vergleichspersonen?
4. Wie ändern sich die AGE-Spiegel im zeitlichen Verlauf, untersucht in Abhängigkeit von Alter und Krankheitsdauer der RA-Patienten?
5. Wie verhalten sich die AGE-Spiegel mit zunehmendem Destruktionsgrad, also chronisch-progredienten Veränderungen, bei RA-Patienten?
6. Gib es Zusammenhänge zwischen den gemessenen AGE-Spiegeln und der Entzündungssymptomatik, überprüft anhand der BSG, des CrP, als systemische Parameter sowie der Synoviazellzahl, als lokalen Parameter?
7. Stehen die AGE-Spiegel in Beziehung zur Höhe des gemessenen Rheumafaktortiters?

4 PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN

4.1 Patienten

4.1.1 Allgemeine Probandenbeschreibung

Als Probanden standen diagnostisch fachärztlich klassifizierte Patienten des Funktionsbereichs Rheumatologie / Osteologie der Klinik für Innere Medizin in Jena zur Verfügung. Als gesunde Vergleichspersonen stellten sich Blutspender des Instituts für Transfusionsmedizin, die älter als 45 Jahre waren, sowie Mitarbeiter der Klinik für Innere Medizin zur Verfügung.

Patienten mit einem Diabetes mellitus wurden von der Untersuchung ausgeschlossen. Es wurden ausschließlich Personen mit normaler Nierenfunktion gemessen am Kreatininspiegel berücksichtigt.

Die Tab. 4.1 stellt die epidemiologischen Daten der Probanden dar. Weitere Details werden im Folgendem geschildert.

Epidemiologische Übersicht				
	RA	Arthrose	SpA	Gesunde
Anzahl-gesamt	139	23	10	59
Verhältnis ♀:♂	83:17 %	66:33 %	30:70 %	56:44 %
Alter [a]	58 ±13	62±9	39±15	50±13
Krankheitsdauer [a]	11±11	7±7	7±9	entfällt
BSG [mm/1.h]	47,3±30	5,5±3,5	22,4±17,0	nicht bestimmt
CrP [mg/l]	57,0±57,6	8,1±10,9	35,8±40,5	nicht bestimmt
RF-pos:RF-neg	88:12 %	entfällt	entfällt	entfällt
Proben-Anzahl				
----- Serum+Synovia	24	9	10	entfällt
nur Serum	109	13	0	59
nur Synovia	6	1	0	entfällt

Tab. 4.1 Epidemiologische Übersicht mit Angabe der Probandenanzahl, des Geschlechtsverhältnisses, des durchschnittlichen Alters, der durchschnittlichen Krankheitsdauer, der durchschnittlich erreichten BSG- sowie CrP-Werte, des Verhältnisses von Rheumafaktor-positiven und –negativen RA-Patienten sowie der Probenverteilung unterschieden nach der Gruppenzugehörigkeit

4.1.2 RA-Patienten

Es wurden 139 RA-Patienten, die die ACR-Kriterien von 1987 (Arnett et al. 1988) erfüllten, berücksichtigt. Von diesen stellten 24 sowohl eine Serum-Probe als auch eine Synovia-Probe, die zeitgleich entnommen wurden, zur Verfügung. Von weiteren 109 Patienten waren nur eine Serum-Probe und von 6 Patienten nur eine Synovia-Probe vorhanden.

Es ergab sich ein Geschlechtsverhältnis von 83% zu 17% mit Überwiegen der Frauen.

Das Durchschnittsalter der RA-Patienten betrug 58 ± 13 Jahre. Durchschnittlich waren sie 11 ± 11 Jahre erkrankt. Die Therapie der Erkrankung erfolgte nach den allgemeingültigen Regeln, d.h. mit einem Basismedikament, nichtsteroidalen Antirheumatika sowie Prednisolon.

4.1.3 Arthrose-Patienten

Bei den Arthrose-Patienten konnten 23 verschiedene Probanden berücksichtigt werden. Die Diagnose wurde anhand von klinischen und radiologischen Kriterien gestellt. Eine Serum-Probe als auch eine dazugehörige Synovia-Probe waren von 9 Patienten vorhanden, ausschließlich eine Serum-Probe lieferten 13 Probanden und von 1 Patienten stand nur die Synovia-Probe für Untersuchungen bereit.

Das Geschlechtsverhältnis Frauen zu Männer betrug 66% zu 33%.

Durchschnittlich waren die Arthrose-Patienten 62 ± 9 Jahre alt und litten 7 ± 7 Jahre an ihrer Erkrankung, wobei aber erwähnt werden soll, dass bei der Arthrose die Festlegung des Erkrankungsbeginns nur relativ ungenau möglich ist, da ein eher schleichender Beginn, der die Patienten erst spät zum Arzt führt, typisch ist. Dennoch wurde hier die Erinnerung an die ersten Beschwerden zugrunde gelegt.

4.1.4 SpA-Patienten

Die SpA-Gruppe, die Gruppe der unspezifischen seronegativen Spondylarthritiden und chronisch verlaufenden reaktiven Arthritiden, ist sehr inhomogen, da hier mehrere verschiedene Erkrankungen eingeordnet wurden. Die entscheidende Gemeinsamkeit dieser Gelenkkrankheiten ist das chronisch-entzündliche Erscheinungsbild sowie der fehlende Nachweis des Rheumafaktors, wobei im allgemeinen medizinischen Sprachgebrauch von Seronegativität gesprochen wird, wenn der Rheumafaktor ≤ 15 IU/ml bzw. der Titer $\leq 1:16$ im Serum zu finden ist. Eine weitere typische Eigenschaft, welche aber nur fakultativ ist, ist der Nachweis des HLA-B27-Allels (Schofield 1996, Sieper und Braun 1995). Der fehlende Nachweis ist kein Ausschlusskriterium. Dieses Allel wird nur überzufällig häufig bei Patienten, die an einer dieser Erkrankungen leiden, gefunden.

In diese Gruppe wurden folgende Probanden eingeordnet:

- 1 weiblicher und 1 männlicher Patient mit einer Spondylitis ankylosans
- 2 männliche Patienten mit einer Arthritis psoriatica
- 1 weiblicher und 3 männliche Patienten mit einer chronisch verlaufenden reaktiven Arthritis, ohne Berücksichtigung der Art der auslösenden Infektion
- 1 männlicher Patient mit einer Arthritis bei Colitis ulcerosa
- 1 weiblicher Patient mit einer Oligoarthritis unklarer Genese

Von all diesen Probanden war eine Serum-Probe, sowie eine dazugehörige Synovia-Probe vorhanden.

Das durchschnittliche Alter dieser Patienten betrug 39 ± 15 Jahre und sie waren 7 ± 9 Jahre erkrankt.

4.1.5 Gesunde Vergleichspersonen

Für die Untersuchungen konnten 59 gesunde Personen zum Vergleich herangezogen werden. Von ihnen lagen nur Serum-Proben vor, da eine Gelenkpunktion ohne Erguss nicht zumutbar war und außerdem aus einem gesunden Gelenk nicht ohne weiteres Flüssigkeit zu gewinnen ist.

Die Gruppe bestand aus 33 Frauen und 26 Männer, entsprechend 56% zu 44%, also ein leichtes Überwiegen der weiblichen Probanden.

Das Durchschnittsalter betrug 50 ± 13 Jahre.

4.1.6 Gruppenvergleiche

Die oben genannten Ausführungen dienten zur genaueren Charakterisierung der in die Studie eingeschlossenen Probanden-Gruppen. Aus diesem Pool wurden entsprechende Kollektive für den Vergleich zwischen den einzelnen Erkrankungen bzw. mit den Gesunden zusammengestellt, die eine Vergleichbarkeit unter Berücksichtigung des Alters ermöglichen (Wisotzky et al. 1996; Münch et al. 1997). Es wurden also nicht immer alle zur Verfügung stehenden Daten in den entsprechenden Vergleich mit einbezogen, sondern dem Vergleich angemessen jüngere oder ältere Probanden unberücksichtigt gelassen.

Das konkrete Vorgehen dieser Altersanpassung wird im Kapitel 5.1 beschrieben und wird dem dazugehörigen Vergleich vorangestellt.

4.2 Geräte und Chemikalien

4.2.1 Geräte

HPLC-Anlage von Merck-Hitachi, Darmstadt, Deutschland

bestehend aus: Gradientenpumpe L7100

Autosampler L7200

Fluoreszenzdetektor L7480

Computerinterface D7000

RP-18-Säule (CLiChroCART®250-4 von Merck, Darmstadt, Deutschland)

Pic-Tag-Reaktionsgefäße, Waters, USA

Ultrafree MC 0,45 µm, Millipore Corporation, USA

Probengefäße, Kupfer, Deutschland

ELISA-Reader (SLT-Spektra), SLT Labinstrumente Deutschland, Cailsheim

Serum-Monovetten, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Vortex Typ REAX 2000, Heidolph, Deutschland

Biofuge fresco, Heraeus Instruments, Gera, Deutschland

Heißluftofen, Memmert, Deutschland

diverse allgemein gebräuchliche Laborgeräte

4.2.2. Chemikalien

CML-ELISA-Kit für Forschungszwecke, Roche-Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland

10 n Salzsäure, Merck, Darmstadt, Deutschland

5 n Natronlauge, Merck, Darmstadt, Deutschland

Phosphatpuffer, Merck, Darmstadt, Deutschland

Acetonitril, Merck, Darmstadt, Deutschland

PBS-Puffer, GIBCO BRL

Trifluoressigsäure, Fluka, Steinheim, Deutschland

4.3. Methoden

4.3.1 Probengewinnung und Aufbewahrung

Die zur Serumgewinnung benötigten Blutproben wurden vormittags mittels Venenpunktion gewonnen. Anschließend wurde nach üblichem Verfahren das Serum abzentrifugiert und bei -80°C eingefroren um die Proben haltbar zu machen.

Sofern dies notwendig und möglich war, wurde gleichzeitig ein Gelenk punktiert. Voraussetzung dafür war allerdings die klinische Manifestation eines Gelenkergusses, der mittels

Punktion entlastungswürdig war. Daher konnten auch keine Synovia-Proben von gesunden Probanden berücksichtigt werden. Die Synovia-Proben wurden ebenfalls bei -80°C konserviert. Es wurde fast ausschließlich das Kniegelenk punktiert, nur ein Punktat stammt von einem Ellbogengelenk.

4.3.2 Pentosidin-Bestimmung

Der Pentosidin-Messung lag die HPLC-Methode zugrunde, wie sie von Miyata publiziert wurde (Miyata et al. 1996d; Miyata et al. 1997b).

Es wurde folgendermaßen vorgegangen:

1. 50 μl einer Serum- bzw. Synovia-Probe wurden 50 μl Salzsäure (10 n HCl) zugesetzt. Nach kurzzeitigem kräftigen maschinellen Schütteln wurde eine N_2 -Atmosphäre über dem Ansatz durch dreimaliges Absaugen der Luft mit folgendem Ausgleich des Unterdrucks mit N_2 -Gas erzeugt. Über ca. 16 h fand dann bei 110°C eine Hydrolyse statt, bei der das Pentosidin in seine protein- bzw. peptidfreie Form überführt wurde.
2. Zur folgenden Neutralisierung des Hydrolysats wurden 100 μl Natronlauge (5 n NaOH) sowie 200 μl Phosphatpuffer (0,5 m, pH=7,4) eingesetzt.
3. Die Reinigung des Ansatzes geschah durch Ultrazentrifugation mittels Millipore-Filter (0,45 μm Porengröße).
4. 100 μl des erhaltenen Überstandes wurden mit 900 μl PBS-Puffer weiter verdünnt.
5. In dieser Verdünnung wurde der Pentosidin-Gehalt nach Gradiententrennung an einer RP-18-Säule mittels HPLC (high performance liquid chromatography) unter Fluoreszenzdetektion bestimmt (Wellenlängen: Excitation 335 nm; Emission 385 nm). Zur Kalibrierung der HPLC-Methode stand eine Standardlösung mit definierten Konzentrationen an synthetischem Pentosidin zur Verfügung.

Die HPLC-Anlage bestand aus einer Gradientenpumpe (L7100), Autosampler (L7200), Fluoreszenzdetektor (L7480) und Computerinterface (D7000). Als Laufmittel wurde Wasser mit 0,1 % iger Trifluoressigsäure (Phase A) und Acetonitril (Phase B) eingesetzt. Das Zeitprogramm setzte sich aus den in Tab. 4.2 aufgeführten Gradienten zusammen.

Der Pentosidin-Gehalt wurde in pmol/mg angegeben, wobei sich die Stoffmenge des Pentosidins auf die Proteinmasse in der zugrundeliegenden Flüssigkeit bezieht.

4.3.3 CML-Bestimmung

Zur Messung der CML-Spiegel in Serum als auch Synovia stand ein kompetitives ELISA-System (Roche Diagnostics GmbH) zur Austestung für Forschungszwecke zur Verfügung.

Zeitprogramm der HPLC-Messung			
Zeit [min]	Phase A [%]	Phase B [%]	
0	100	0	Trennung
16	90	10	
18	90	10	
22	0	100	Reinigung
26	0	100	
30	100	0	Äquilibration
37	100	0	

Tab. 4.2 Zeitprogramm der HPLC-Messung mit Angabe der Gradienten

Um die Proben vorzubereiten, wurden 10 µl Serum bzw. Synovia mit 100 µl Proteinase K-Lösung (1,1 mg Protein K pro ml Waschpuffer) ca. 16 h bei 37 °C inkubiert. Der Proteinverdau wird durch 100 µl PMSF-Lösung (350 µg/ml Waschpuffer) gestoppt.

Im einzelnen beinhaltet der Assay folgende Arbeitsschritte:

1. Die Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatten (96 Wells) wurden mit biotinyliertem glyciertem BSA (AGE-BSA-Lösung) beladen und anschließend unter Schütteln bei Raumtemperatur über 1h inkubiert
2. Nach dreimaligem Waschen der Wells wurden 50 µl Probe (nach Proteinase K-Verdau) bzw. Standardlösung sowie 50 µl Antikörperlösung (horse-radish-peroxidase-konjugierter monoklonaler Maus-anti-CML-Antikörper, 4G9) zugesetzt. Unter Schütteln bei Raumtemperatur wurde dieser Ansatz über 1 h inkubiert.
3. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde der Ansatz mit 100 µl ABTS-Natriumperborat-Substratlösung (ABTS[®]: 2,2-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolinsulfonat (6)] diammoniumsalt) versetzt und wiederum einer 30-minütigen Inkubation unter Schütteln bei Raumtemperatur unterzogen.
4. Anschließend wurde die Extinktion bei 405 nm gemessen und daraus mittels der Standardlösungen mit bekannter Konzentration die CML-Konzentration in der Probe bestimmt.

Die Nachweisgrenze des verwendeten ELISA-Systems lag bei 5 ng CML/ml.

Als Intraassay-Präzision wurde ein Wert von <5% ermittelt. Die Interassay-Präzision lag bei <7%.

Der CML-Gehalt wird äquivalent zum Pentosidin-Gehalt in pmol/mg angegeben.

4.3.4 Bestimmung von Proteingehalt, CrP und Kreatinin

Da es sich bei dem Proteingehalt, CrP als auch Kreatinin um Routineparameter handelt, die auch bei der Patientenbetreuung eine Rolle spielen, konnten sie vollautomatisiert durch die Laboratorien des Instituts für Klinische Chemie der Friedrich-Schiller-Universität bestimmt werden.

Nur wenn die Parameter in den Patientenunterlagen zu dementsprechenden Probenabnahmetagen nicht sicher und eindeutig dokumentiert waren, wurde eine Nachbestimmung aus den konservierten Serum-Proben vorgenommen. In den Synovia-Proben wurde grundsätzlich der Proteingehalt nachbestimmt, da dies in der geforderten Exaktheit routinemäßig nicht unbedingt üblich ist.

Der Proteingehalt wurde in g/l bestimmt und diente dazu, den volumenbezogenen Pentosidin- bzw. CML-Spiegel auf die Proteinmenge zu beziehen, da die Entstehung dieser AGEs proteinabhängig ist (Nawroth et al. 1999), so dass die Werte Vergleichbarkeit erreichten. In mg/l wurde das CrP angegeben.

Der Kreatinin-Spiegel in $\mu\text{mol/l}$ diente nur zu Kontrollzwecken des Probandenkollektivs.

4.3.5 Bestimmung der BSG

Die Blutsenkungsgeschwindigkeit, ebenfalls ein Routineparameter, wurde nach der Methode von Westergren bestimmt und in mm/1.h gemessen.

Da für diese Untersuchung Vollblut, welches nicht konserviert wurde, nötig war, konnte für diesen Parameter keine Nachbestimmung erfolgen. Es konnten also nur die eindeutig dokumentierten Werte aus den Patientenunterlagen berücksichtigt werden.

In die Auswertung miteinbezogen wurde nur der 1-Stunden-Wert.

4.3.6 Bestimmung der Synovia-Zellzahl

Zur Quantifizierung einer lokalen Entzündungsreaktion im Gelenk wurde die Synovia-Zellzahl eingesetzt. Sie wurde durch die Mitarbeiter des rheumatologischen Forschungslabors bestimmt.

Aus dem frisch gewonnenen, noch etwa körperwarmen Gelenkpunktat wurden mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer alle Zellen, d.h. ohne Differenzierung des Zelltyps, ausgezählt. Das war natürlich nur sehr kurz nach der Punktion möglich und diente ursprünglich der diagnostischen Beurteilung der Patienten. Die dabei erhaltenen Ergebnisse wurden in den Krankenakten dokumentiert und retrospektiv für diese Untersuchung erfasst.

Die Einheit dieses Parameters war GPT/l.

4.3.7 Bestimmung des Rheumafaktors

Der Rheumafaktor wurde routinemäßig durch das Institut für Immunologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena bestimmt. Hierbei kamen Agglutinationstests zur Anwendung. Die Höhe des Rheumafaktors wurde als Titer angegeben. Das Ergebnis dieser Untersuchungen wurde nur zur epidemiologischen Charakterisierung der Patienten benutzt.

Die Bestimmungsmethode wurde durch das Institut für Immunologie auf ein nephelometrisches Verfahren umgestellt. Die so bestimmten Rheumafaktoren wurden in IU/ml angegeben und zur epidemiologischen Charakterisierung als auch zu weiteren statistischen Untersuchungen herangezogen.

4.3.8 Einteilung in die Röntgenstadien

Zur Abschätzung des röntgenologischen Destruktionsgrades der Gelenke wurde die Einteilung nach Steinbrocker verwendet (Steinbrocker et al. 1949). Die Einteilung geschah anhand von konventionellen Röntgenaufnahmen der betroffenen Gelenke, die von Mitarbeitern des Instituts für Diagnostische und Interventionelle Radiologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena hergestellt und befundet wurden.

Ausschlaggebend war hierbei das Gelenk mit der am weitesten fortgeschrittenen Zerstörung. Die Stadienzuordnung wurde folgendermaßen getroffen:

- Stadium 0: keinerlei röntgenologische Anzeichen für eine Arthritis oder entzündliche Gelenkdestruktion
- Stadium 1: Nachweis einer gelenknahen Osteoporose, sonst glatt begrenzte Gelenkstrukturen
- Stadium 2: Nachweis von relativ frühen erosiven Veränderungen wie gelenknahen Knochenzysten und / oder Usurierung der artikulierenden Gelenkflächen
- Stadium 3: Nachweis von Subluxationen, z.B. ulnarer Deviation oder anderer abnormaler Gelenkstellungen, also fortgeschrittenen radiologischen Veränderungen bzw. Destruktionen
- Stadium 4: Nachweis totaler Gelenkzerstörung in Form von Luxationen oder Ankylosen.

4.3.9 Statistische Auswertung

Zur statistischen Berechnung von Gruppenmittelwerten und deren Vergleich, zum Beispiel zwischen den einzelnen Erkrankungen bzw. Gesunden oder zwischen den Serum- und Synovia-Spiegeln, wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet. Hierbei

galt ein p-Wert $<0,05$ als signifikant und wurde in Abbildungen und Tabellen mit einem * gekennzeichnet.

Bei der Analyse von Zusammenhängen zwischen verschiedenen Parametern wurde sowohl der Korrelationsfaktor nach Pearson r_P , der das lineare Verhalten beschreibt, als auch der Korrelationsfaktor nach Spearman r_S , der monotonen, nicht nur lineares Verhalten analysiert, bestimmt. Auch hierbei wurde die Signifikanz der Korrelationsfaktoren berücksichtigt (p_P bzw. p_S), wobei die oben angegebenen Bedingungen für Signifikanzen ebenfalls gelten.

Alle statistischen Ergebnisse wurden mit Hilfe des Statistik-Programms „SPSS für Windows, Version 10.0“ erstellt.

5 ERGEBNISSE

5.1 Vergleich von Pentosidin und CML von RA-Patienten mit Patienten, die an anderen Gelenkerkrankungen leiden sowie Gesunden

5.1.1 Gesamtübersicht

Zuerst werden die durchschnittlich erreichten Pentosidin- und CML-Spiegel in Serum und Synovia unter Berücksichtigung aller verfügbaren Probanden nur unterschieden nach der Gelenkerkrankung dargestellt.

Die höchsten Pentosidin-Spiegel im Serum als auch in der Synovia erreichten die RA-Patienten, gefolgt von den Arthrose-Patienten, anschließend kommen die SpA-Patienten. Nur unwesentlich niedrigere Serum-Pentosidin-Spiegel als die SpA-Probanden erreichten die Gesunden. Die Synovia-Pentosidin-Spiegel waren immer kleiner als die dazugehörigen Serum-Spiegeln. (Abb. 5.1, Tab. 5.1)

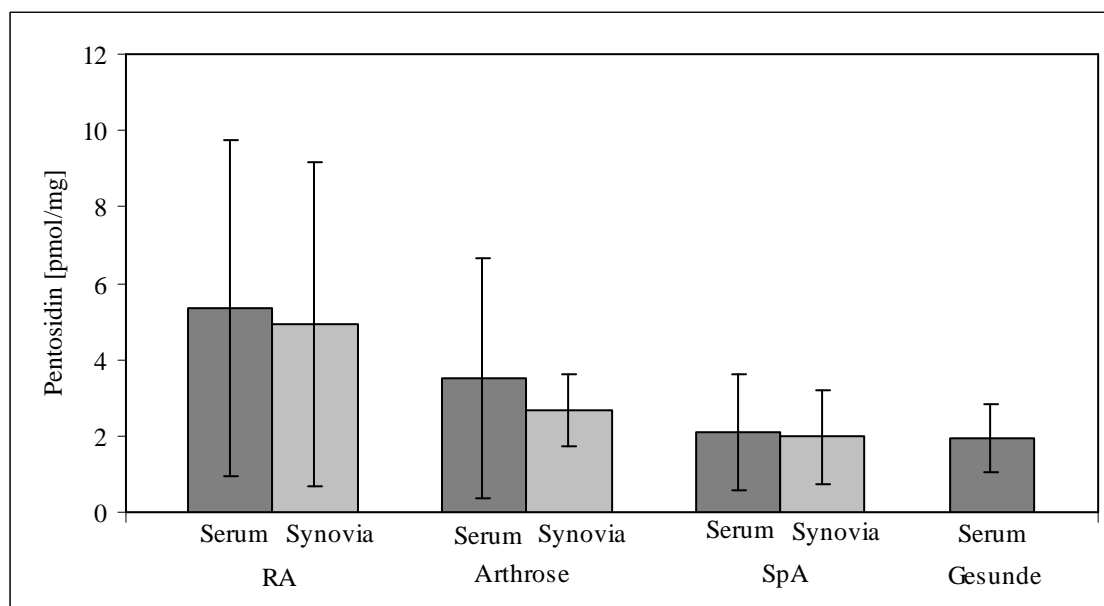


Abb. 5.1 Vergleich der Pentosidin-Spiegel in Serum und Synovia bei Patienten mit RA, Arthrose und SpA sowie gesunden Vergleichspersonen (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Die Serum-CML-Spiegel erreichten in allen Gruppen ein nahezu identisches Niveau. Auch hier waren die Synovia-CML-Spiegel immer geringer als die entsprechenden Serum-Spiegel. Den geringsten durchschnittlichen Synovia-CML-Spiegel erreichten die Arthrose-Patienten. Die Synovia-CML-Spiegel der RA- und SpA-Patienten waren fast gleich, lagen aber über denen der Arthrose-Patienten. (Abb. 5.2, Tab 5.1)

Gesamtübersicht über Pentosidin- und CML-Spiegel in Serum und Synovia				
	RA	Arthrose	SpA	Gesunde
Serum-Pentosidin	5,36±4,4	3,52±3,14	2,08±1,51	1,93±0,89
Anzahl	133	23	10	59
Synovia-Pentosidin	4,92±4,24	2,67±0,96	1,98±1,23	entfällt
Anzahl	30	9	10	
Serum-CML	30,2±7,7	30,5±7,3	30,85±5,52	31,8±5,6
Anzahl	133	23	9	59
Synovia-CML	22,8±6,8	18,3±4,4	22,8±7,7	entfällt
Anzahl	19	8	7	

Tab. 5.1 Gesamtübersicht der Ergebnisse der Pentosidin- und CML-Spiegel in Serum und Synovia bei allen verfügbaren Probanden unterschieden nach Gelenkerkrankung (Pentosidin in pmol/mg, CML in pmol/mg; Mittelwert ± Standardabweichung; Anzahl: Probandenzahl, die dem angegebenen Mittelwert zugrunde liegen)

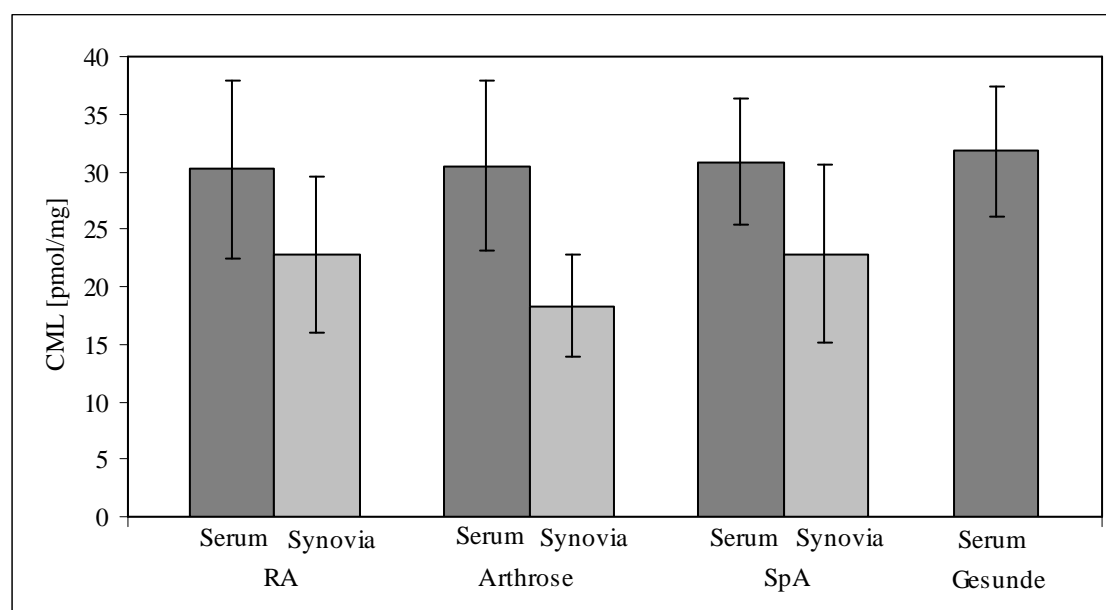


Abb. 5.2 Vergleich der CML-Spiegel in Serum und Synovia bei Patienten mit RA, Arthrose und SpA sowie gesunden Vergleichspersonen (Mittelwert ± Standardabweichung)

Die statistische Sicherheit dieser Unterschiede wurde nicht angegeben, da bis auf den Vergleich der RA- mit den Arthrose-Patienten immer signifikante Altersunterschiede bestanden, die die Beurteilbarkeit erheblich behinderten. Im Folgenden wird auf die Spiegel-Unterschiede unter besonderer Berücksichtigung der Altersgleichheit noch im Detail eingegangen.

5.1.2 Vergleich RA mit Arthrose

Die Patienten mit einer RA haben höhere Pentosidin-Spiegel im Serum als auch in der Synovia. Eine Signifikanz dieser Unterschiede konnte aber nicht nachgewiesen werden. (Abb. 5.3, Tab. 5.2)

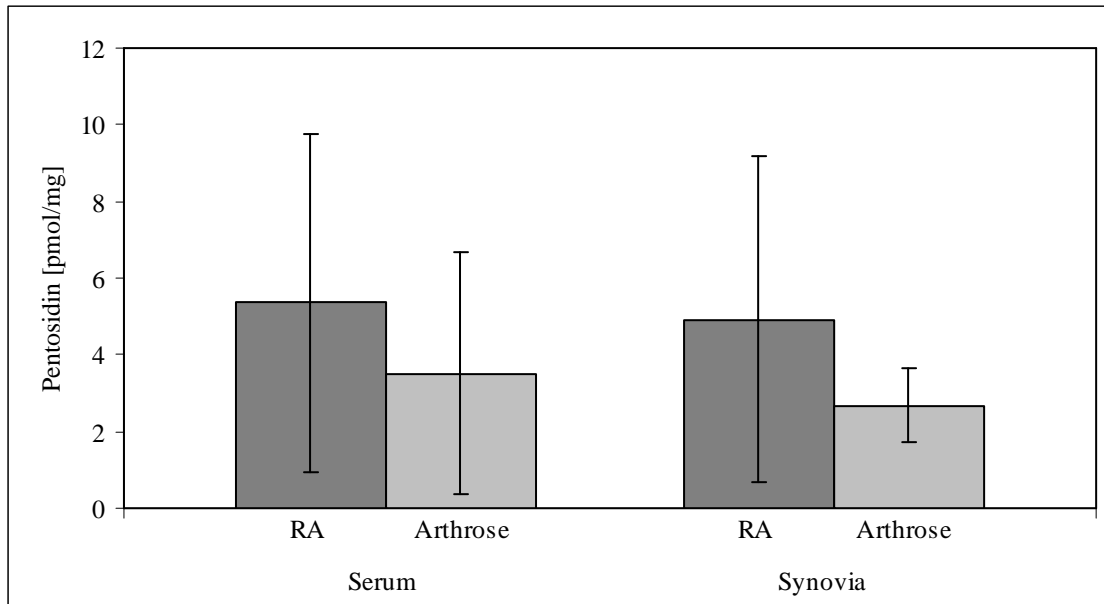


Abb 5.3 Vergleich der Pentosidin-Spiegel in Serum und Synovia bei Patinten mit RA sowie Arthrose (Mittelwert \pm Standardabweichung)

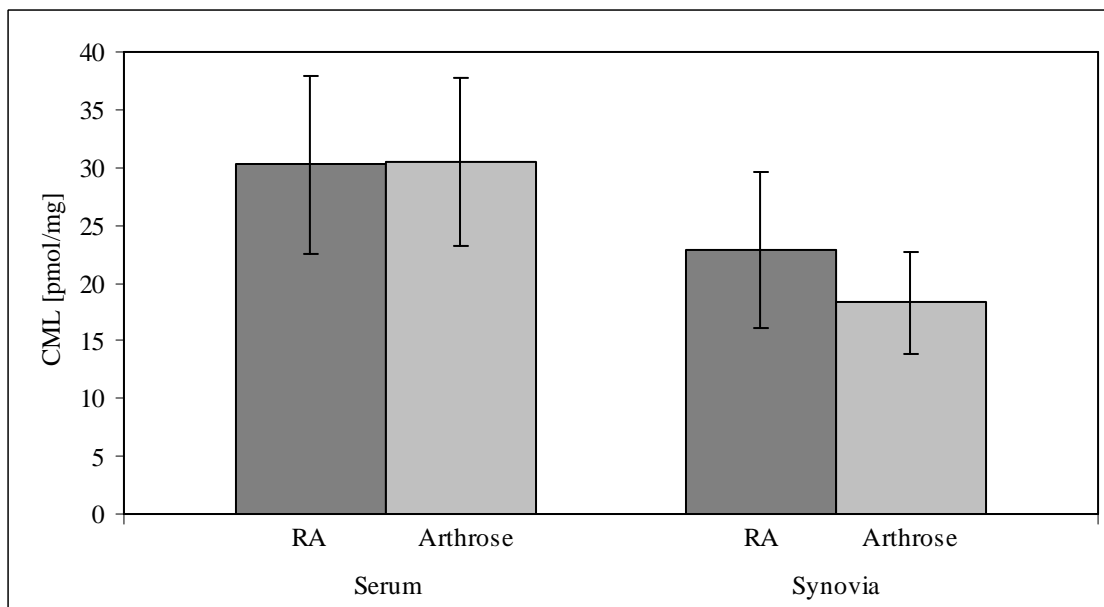


Abb 5.4 Vergleich der CML-Spiegel in Serum und Synovia bei Patienten mit RA sowie Arthrose (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Bezüglich der CML-Spiegel konnte festgestellt werden, dass die RA-Patienten diskret niedrigere Serum-Werte aufwiesen als die Arthrose-Patienten. Die Synovia-CML-Spiegel

verhalten sich umgekehrt, das heißt, höhere Spiegel bei RA-Patienten gegenüber Patienten mit Arthrose. Auch hier ließ sich der Unterschied nicht signifikant sichern. (Abb. 5.4, Tab. 5.2) Bei dieser Untersuchung konnten alle entsprechenden Probanden, die der Studie zur Verfügung standen, berücksichtigt werden, da sie sich nicht signifikant bezüglich des Alters unterschieden.

Vergleich zwischen RA und Arthrose				
	Parameter	RA	Arthrose	Signifikanz p
Serum-Pentosidin	Anzahl	133	23	0,522
	Alter	58±13	61±9	
	Pentosidin	5,36±4,40	3,52±3,14	
Serum-CML	Anzahl	133	23	0,522
	Alter	58±13	61±9	
	CML	30,2±7,7	30,5±7,3	
Synovia-Pentosidin	Anzahl	30	9	0,228
	Alter	56±12	62±11	
	Pentosidin	4,92±4,24	2,67±0,96	
Synovia-CML	Anzahl	19	8	0,095
	Alter	56±12	64±9	
	CML	22,8±6,8	18,3±4,4	

Tab. 5.2 Übersicht über die Ergebnisse des Vergleichs zwischen RA und Arthrose bezüglich der Pentosidin- und CML-Spiegel in Serum und Synovia (Anzahl, Alter in Jahren: beziehen sich auf die dem einzelnen Vergleich zugrundeliegende Probandenzahl, Pentosidin in pmol/mg, CML in pmol/mg; Mittelwert ± Standardabweichung)

5.1.3 Vergleich RA mit SpA

Da das Durchschnittsalter der SpA-Patienten wesentlich geringer war als das der RA-Patienten, musste eine Alterskorrektur der Gruppen erfolgen. Diese wurde erreicht, indem bei der RA-Gruppe nur Patienten berücksichtigt wurden, die 55 Jahre alt oder jünger waren, sowie alle untersuchten SpA-Probanden.

Der Vergleich ergab, dass sowohl Serum- als auch Synovia-Pentosidin-Spiegel bei Patienten mit RA deutlich höher waren als bei SpA-Patienten, wobei eine Signifikanz des Unterschiedes nur für den Vergleich der Serum-Spiegel nachgewiesen werden konnte. (Abb. 5.5, Tab. 5.3)

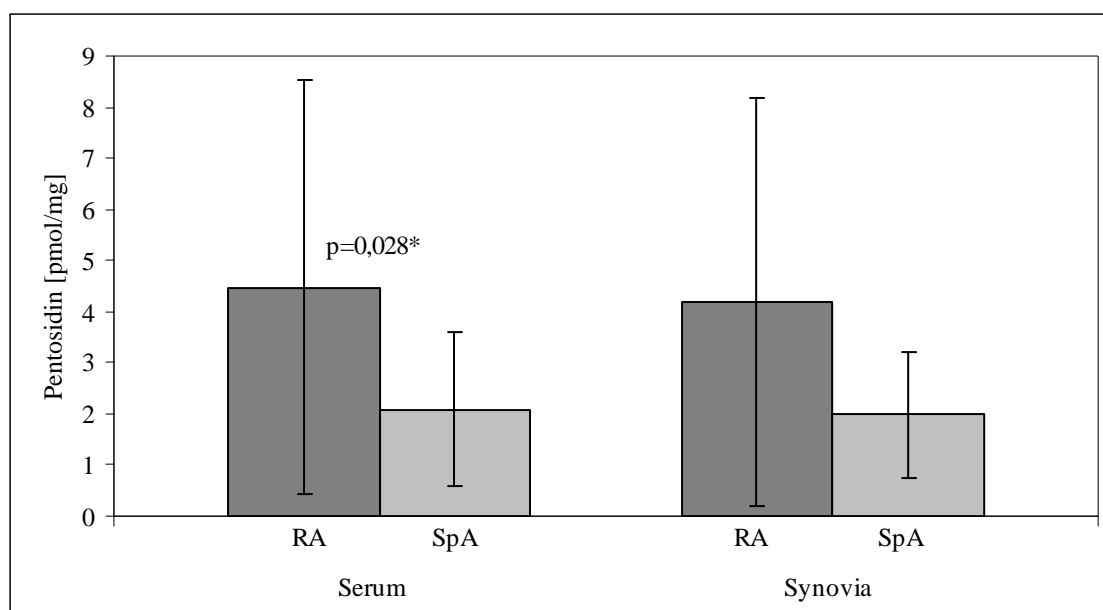


Abb 5.5 Vergleich der Pentosidin-Spiegel in Serum und Synovia bei Patienten mit RA sowie SpA (Mittelwert \pm Standardabweichung, p Signifikanz des Unterschiedes)

Vergleich zwischen RA und SpA				
	Parameter	RA	SpA	Signifikanz p
Serum-Pentosidin	Anzahl	48	10	0,266 0,028*
	Alter	44 \pm 9	39 \pm 15	
	Pentosidin	4,48\pm4,06	2,08\pm1,51	
Serum-CML	Anzahl	48	9	0,511 0,358
	Alter	44 \pm 9	42 \pm 13	
	CML	29,5\pm7,4	30,8\pm5,5	
Synovia-Pentosidin	Anzahl	12	10	0,418 0,228
	Alter	44 \pm 10	39 \pm 15	
	Pentosidin	4,18\pm3,96	1,98\pm1,23	
Synovia-CML	Anzahl	8	7	0,336 0,779
	Alter	45 \pm 8	40 \pm 13	
	CML	22,3\pm6,0	22,8\pm7,7	

Tab. 5.3 Übersicht über die Ergebnisse des Vergleichs zwischen RA und SpA bezüglich der Pentosidin- und CML-Spiegel in Serum und Synovia (Anzahl, Alter in Jahren: beziehen sich auf die dem einzelnen Vergleich zugrundeliegende Probandenzahl, Pentosidin in pmol/mg, CML in pmol/mg; Mittelwert \pm Standardabweichung)

Weiterhin waren die Serum-CML-Spiegel bei SpA-Patienten leicht, aber nicht signifikant erhöht gegenüber der RA-Patienten. Die Synovia-CML-Spiegel waren praktisch gleich. (Abb. 5.6, Tab. 5.3)

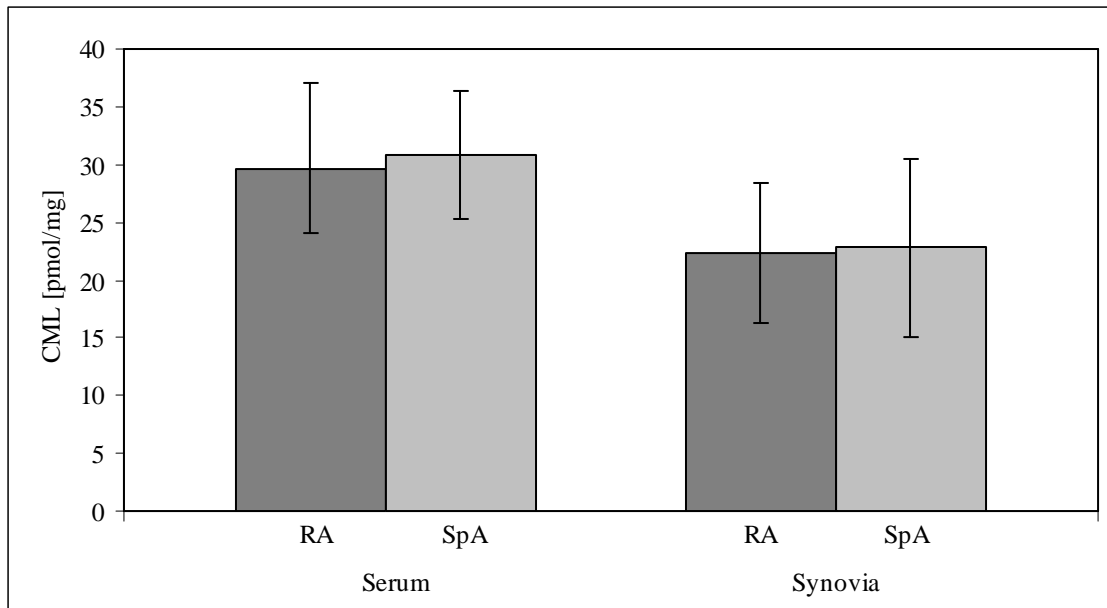


Abb 5.6 Vergleich der CML-Spiegel in Serum und Synovia bei Patienten mit RA und SpA (Mittelwert \pm Standardabweichung)

5.1.4. Vergleich RA mit Gesunden

Aus der Gruppe der Gesunden wurden nur die Probanden berücksichtigt, die älter oder gleich 46 Jahre waren. Von den RA-Patienten wurden alle zur Verfügung stehenden Fälle in den Vergleich mit einbezogen. Dadurch konnte eine Vergleichbarkeit bezüglich des Alters erreicht werden.

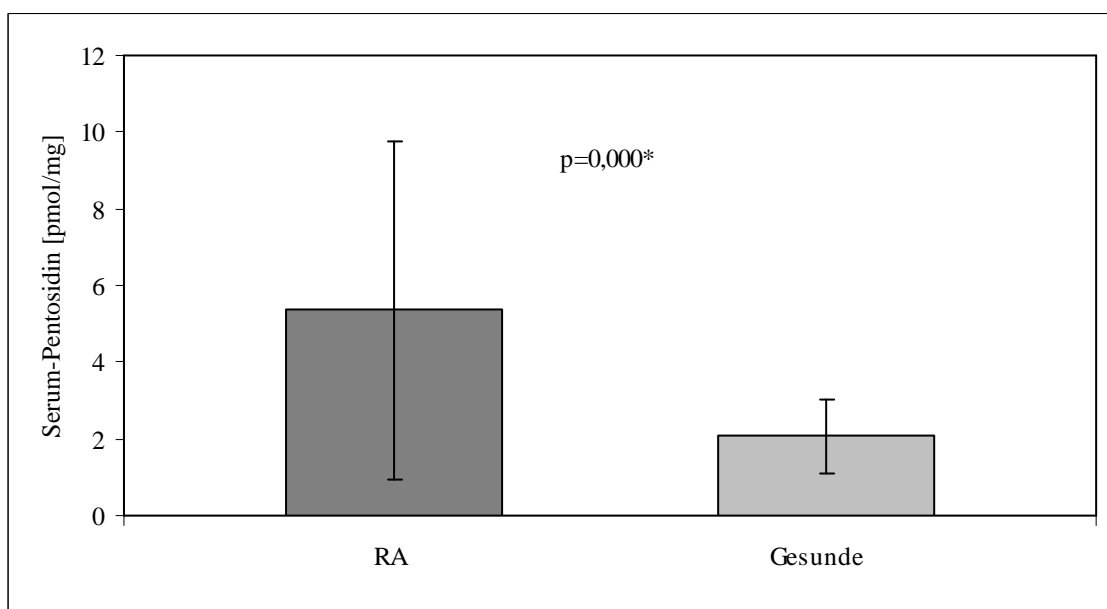


Abb. 5.7 Vergleich der Serum-Pentosidin-Spiegel bei Patienten mit RA sowie Gesunden (Mittelwert \pm Standardabweichung, p Signifikanz des Unterschiedes)

Es zeigte sich, dass die Patienten mit RA deutlich höhere Serum-Pentosidin-Spiegel aufwiesen als die gesunden Vergleichsprobanden. Dieser Unterschied war auch signifikant. (Abb. 5.7, Tab 5.4)

Der Serum-CML-Spiegel zeigte sich leicht, aber dennoch signifikant erhöht bei den Gesunden gegenüber den RA-Patienten. (Abb. 5.8, Tab. 5.4)

Vergleich zwischen RA und Gesunden				
	Parameter	RA	Gesunde	Signifikanz p
Serum-Pentosidin	Anzahl	133	43	0,153
	Alter	58±13	57±6	
	Pentosidin	5,36±4,40	2,07±0,98	
Serum-CML	Anzahl	133	43	0,153
	Alter	58±13	57±6	
	CML	30,2±7,7	32,0±5,4	

Tab. 5.4 Übersicht über die Ergebnisse des Vergleichs zwischen RA und Gesunden bezüglich der Pentosidin- und CML-Spiegel im Serum (Anzahl, Alter in Jahren: beziehen sich auf die dem einzelnen Vergleich zugrundeliegende Probandenzahl, Pentosidin in pmol/mg, CML in pmol/mg; Mittelwert ± Standardabweichung)

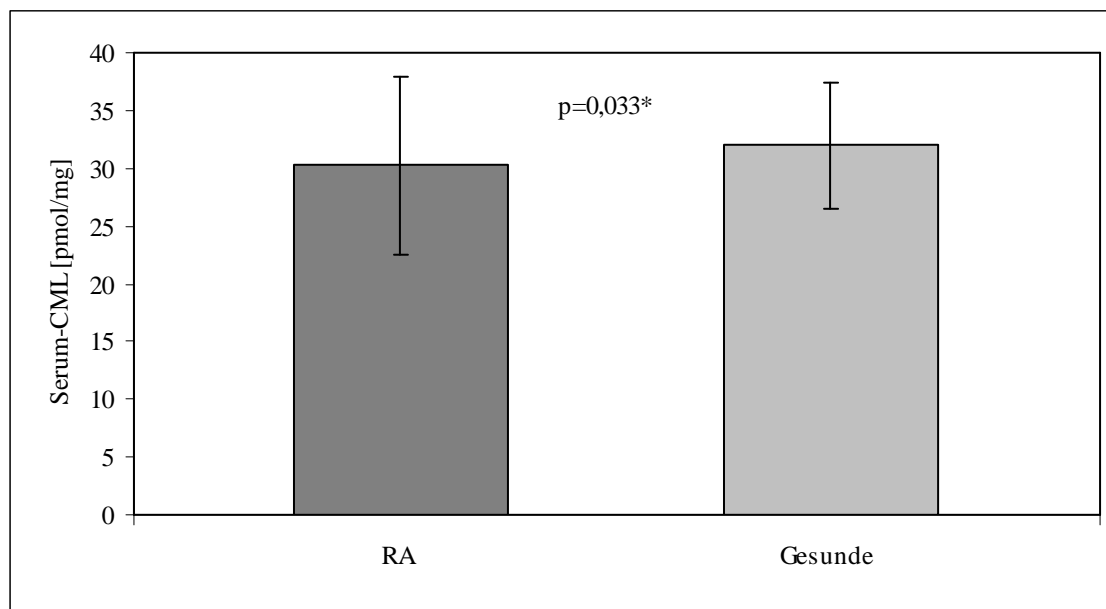


Abb. 5.8 Vergleich der Serum-CML-Spiegel bei Patienten mit RA sowie Gesunden (Mittelwert ± Standardabweichung, p Signifikanz des Unterschiedes)

5.1.5 Vergleich Gesunde mit Arthrose

In die Untersuchung gingen nur gesunde Vergleichspersonen ein, die das 50. Lebensjahr schon erreicht hatten, sowie alle in der Studie erfassten Arthrose-Patienten.

Es zeigten sich wieder erhöhte Serum-Pentosidin-Spiegel bei den Kranken, also bei den Arthrose-Patienten, gegenüber den Gesunden. Auch hier konnte keine Signifikanz nachgewiesen werden. (Abb. 5.9, Tab. 5.5)

Genauso wenig wie für den Unterschied für die Serum-CML-Spiegel, die bei gesunden Probanden leicht erhöht waren im Unterschied zu den Patienten mit Arthrose. (Abb. 5.10, Tab. 5.5)

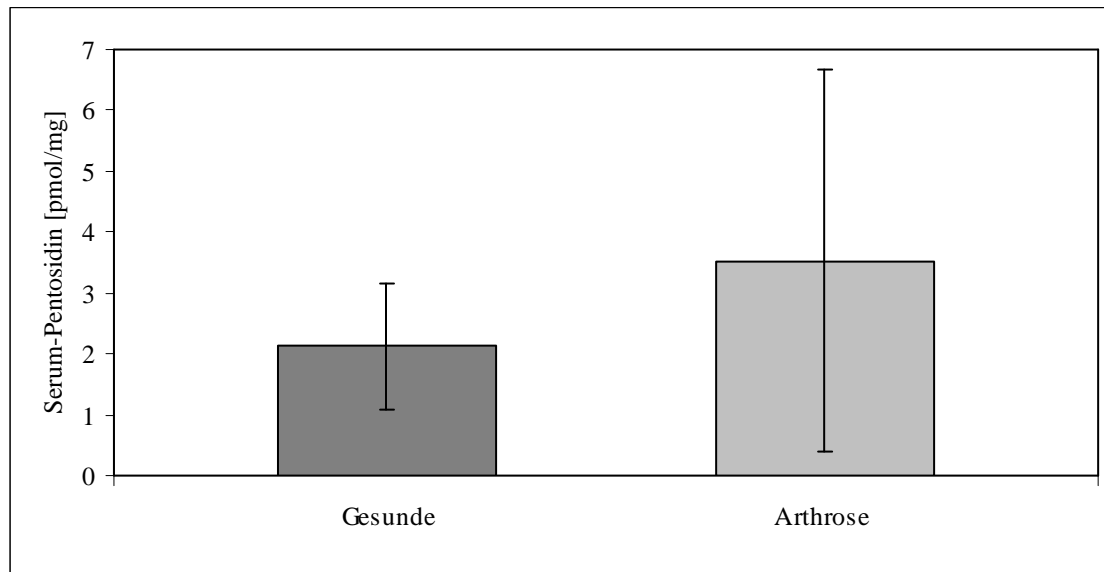


Abb. 5.9 Vergleich der Serum-Pentosidin-Spiegel bei Gesunden sowie Patienten mit Arthrose (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Vergleich zwischen Gesunden und Arthrose				
	Parameter	Gesunde	Arthrose	Signifikanz p
Serum-Pentosidin	Anzahl	37	23	0,229
	Alter	58 \pm 7	61 \pm 9	
	Pentosidin	2,13\pm1,03	3,52\pm3,14	
Serum-CML	Anzahl	37	23	0,229
	Alter	58 \pm 7	61 \pm 9	
	CML	32,3\pm7,3	30,4\pm7,3	

Tab. 5.5 Übersicht über die Ergebnisse des Vergleichs zwischen Gesunden und Arthrose bezüglich der Pentosidin- und CML-Spiegel im Serum (Anzahl, Alter in Jahren: beziehen sich auf die dem einzelnen Vergleich zugrundeliegende Probandenzahl, Pentosidin in pmol/mg, CML in pmol/mg; Mittelwert \pm Standardabweichung)

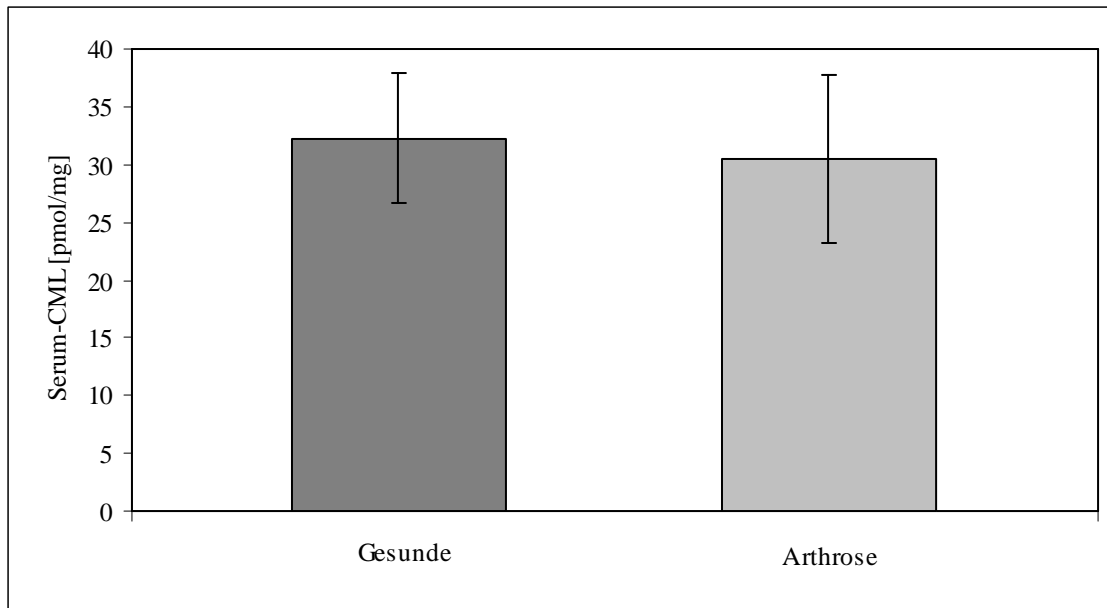


Abb. 5.10 Vergleich der Serum-CML-Spiegel bei Gesunden sowie Patienten mit Arthrose (Mittelwert \pm Standardabweichung)

5.1.6 Vergleich Gesunde mit SpA

Ein Vergleich der beiden Gruppen war dadurch möglich, dass nur Gesunde mit einem Alter von 60 Jahren oder jünger, hingegen alle beurteilten SpA-Vertreter in den Vergleich eingeschlossen wurden.

Die Patienten mit SpA erreichten durchschnittlich höhere Pentosidin-Spiegel im Serum als gesunde Vergleichsprobanden. Eine Signifikanz des Unterschieds konnte aber nicht nachgewiesen werden. (Abb. 5.11, Tab. 5.6)

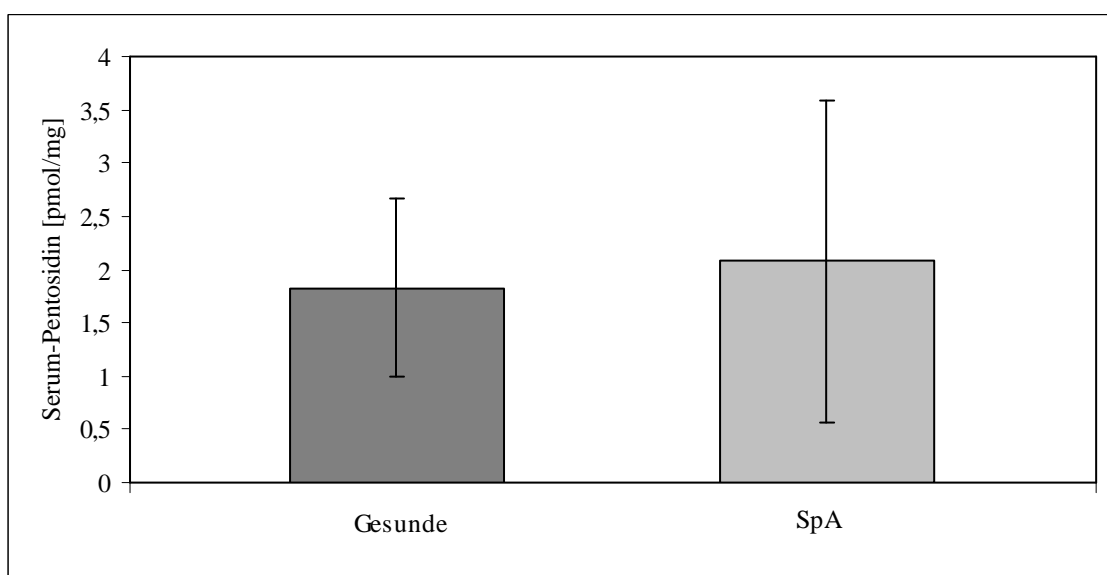


Abb. 5.11 Vergleich der Serum-Pentosidin-Spiegel bei Gesunden sowie Patienten mit SpA (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Vergleich zwischen Gesunden und SpA				
	Parameter	Gesunde	SpA	Signifikanz p
Serum-Pentosidin	Anzahl	47	10	0,133
	Alter	46±11	39±15	
	Pentosidin	1,83±0,84	2,08±1,51	
Serum-CML	Anzahl	47	9	0,284
	Alter	46±11	42,13	
	CML	31,5±6,0	30,8±5,5	

Tab. 5.6 Übersicht über die Ergebnisse des Vergleichs zwischen Gesunden und SpA bezüglich der Pentosidin- und CML-Spiegel im Serum (Anzahl, Alter in Jahren: beziehen sich auf die dem einzelnen Vergleich zugrundeliegende Probandenzahl, Pentosidin in pmol/mg, CML in pmol/mg; Mittelwert ± Standardabweichung)

Ebenfalls ein nicht signifikantes Ergebnis erbrachte die Untersuchung der Serum-CML-Spiegel. Hier wiesen die Gesunden diskret höhere, also praktisch gleiche Werte auf, wie die SpA-Patienten. (Abb. 5.12, Tab. 5.6)

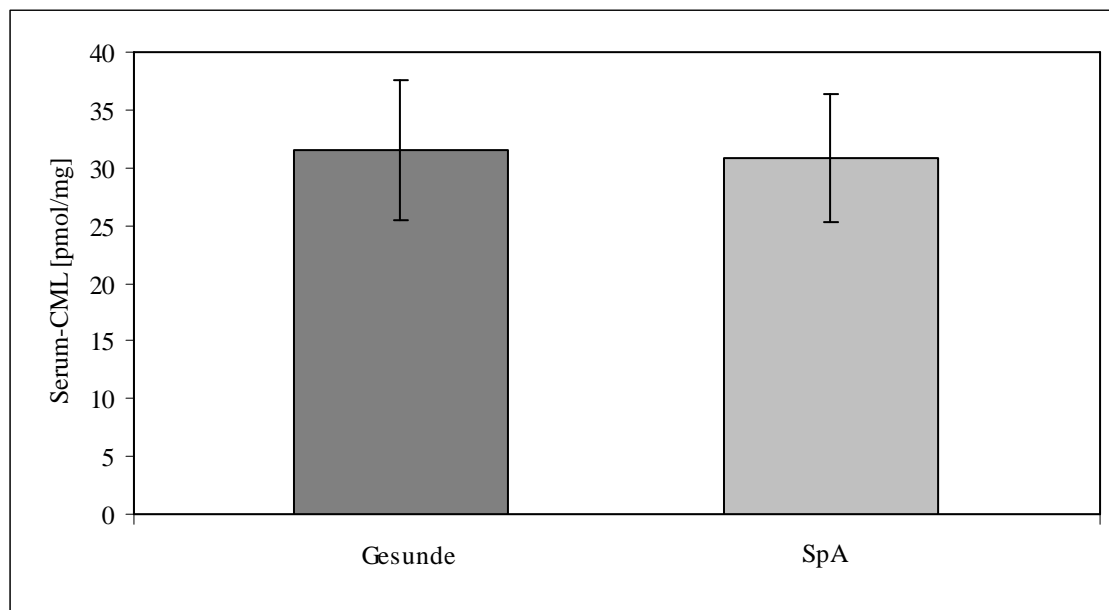


Abb. 5.12 Vergleich der Serum-CML-Spiegel bei Gesunden sowie Patienten mit SpA (Mittelwert ± Standardabweichung)

5.2 Zusammenhang zwischen Pentosidin als auch CML und klinischen sowie paraklinischen Parametern bei RA-Patienten

5.2.1 Zusammenhang zwischen Serum- und Synovia-Spiegeln von Pentosidin sowie CML

Bei dem Vergleich der Serum-Pentosidin-Spiegel mit den Synovia-Pentosidin-Spiegeln ergab sich ein signifikanter Korrelationfaktor sowohl nach Pearson ($r_p=0,855$ mit $p_p=0,000$), als

auch nach Spearman ($r_s=0,800$ mit $p_s=0,000$) (Abb. 5.13). Weiterhin ist auch der Mittelwert der Serum-Pentosidin-Spiegel höher als der Durchschnitt der Synovia-Pentosidin-Spiegel, wenn die Daten aller RA-Patienten berücksichtigt werden. Dieser Unterschied ist aber nicht signifikant (Tab. 5.7, Abb. 5.1).

Ähnlich verhält es sich auch mit den Serum- und Synovia-CML-Spiegeln der RA-Patienten, wenngleich die Korrelation nach Pearson ($r_p=0,576$ mit $p_p=0,020$), als auch nach Spearman ($r_s=0,562$ mit $p_s=0,024$) weniger streng, aber immer noch signifikant ist (Abb. 5.14). Wenn wieder alle Patienten mit einer RA berücksichtigt werden, ist der Serum-CML-Spiegel im Durchschnitt signifikant höher als der Synovia-Spiegel von CML (Tab. 5.7, Abb. 5.2).

Vergleich zwischen Serum- und Synovia-Spiegel von Pentosidin sowie CML bei RA			
	Serum-Spiegel	Synovia-Spiegel	Signifikanz p
Pentosidin	133 5,36±4,40	30 4,92±4,24	0,056
CML	133 30,2±7,7	19 22,8±6,8	0,007*

Tab. 5.7 Übersicht über die Serum- und Synovia-Spiegel von Pentosidin und CML bei Patienten mit RA (Pentosidin in pmol/mg, CML in pmol/mg; Mittelwert ± Standardabweichung, darüber Anzahl der zugrunde liegenden Fälle)

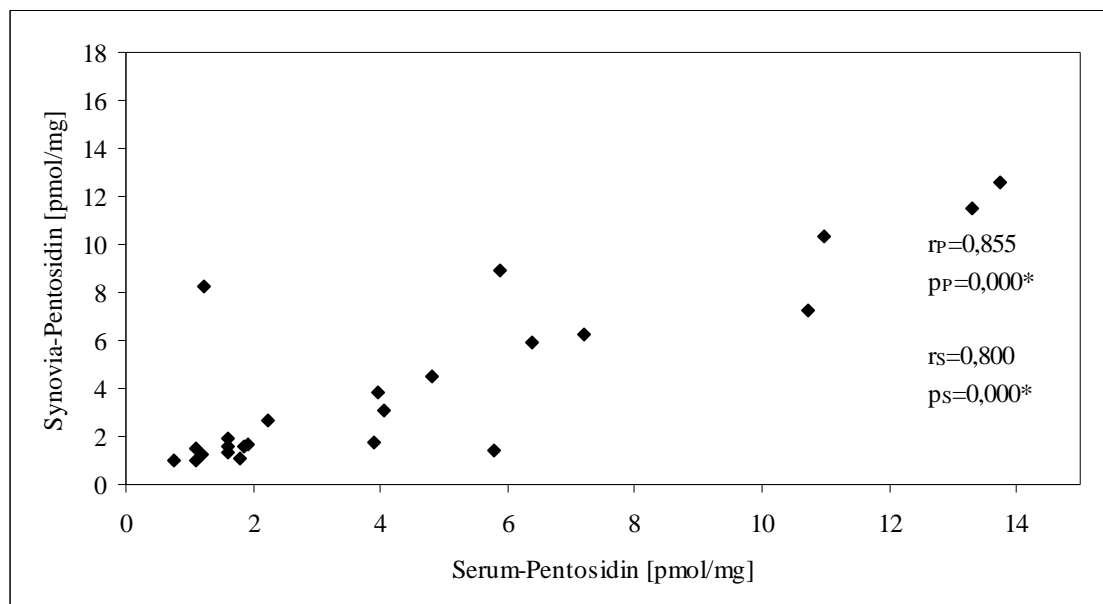


Abb. 5.13 Korrelation zwischen Serum-Pentosidin-Spiegel und Synovia-Pentosidin-Spiegel bei Patienten mit RA

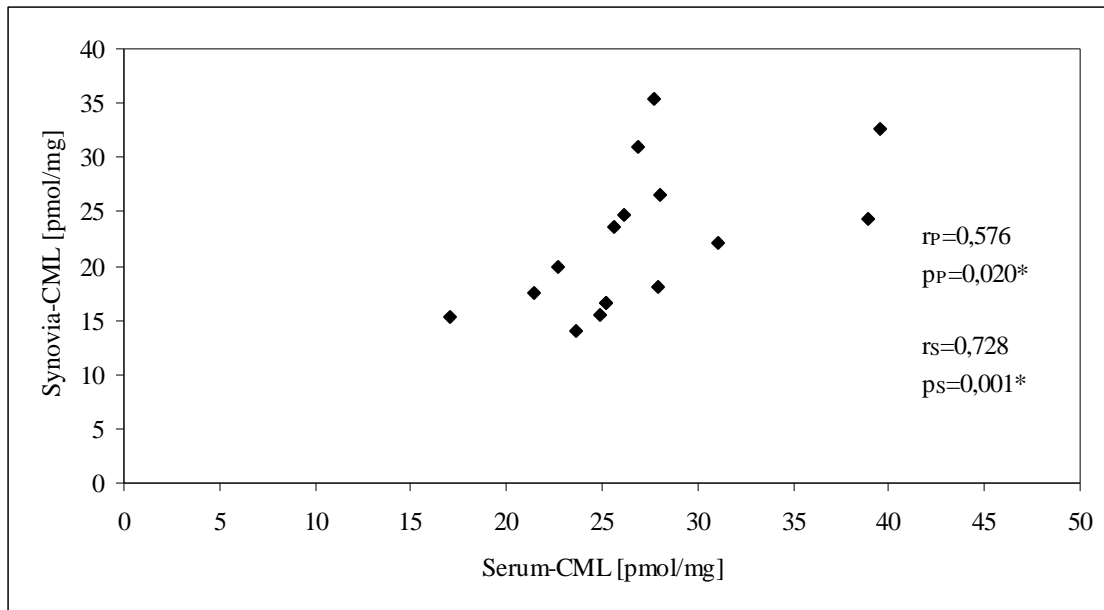


Abb. 5.14 Korrelation zwischen Serum-CML-Spiegel und Synovia-CML-Spiegel bei Patienten mit RA

5.2.2 Abhängigkeit des Pentosidin und CML von der Krankheitsdauer und dem Alter

Der Synovia-Pentosidin-Spiegel korreliert signifikant mit der Krankheitsdauer nach Pearson ($r_P = 0,435$ mit $p_P = 0,018$) als auch nach Spearman ($r_S = 0,449$ mit $p_S = 0,014$) (Abb. 5.15).

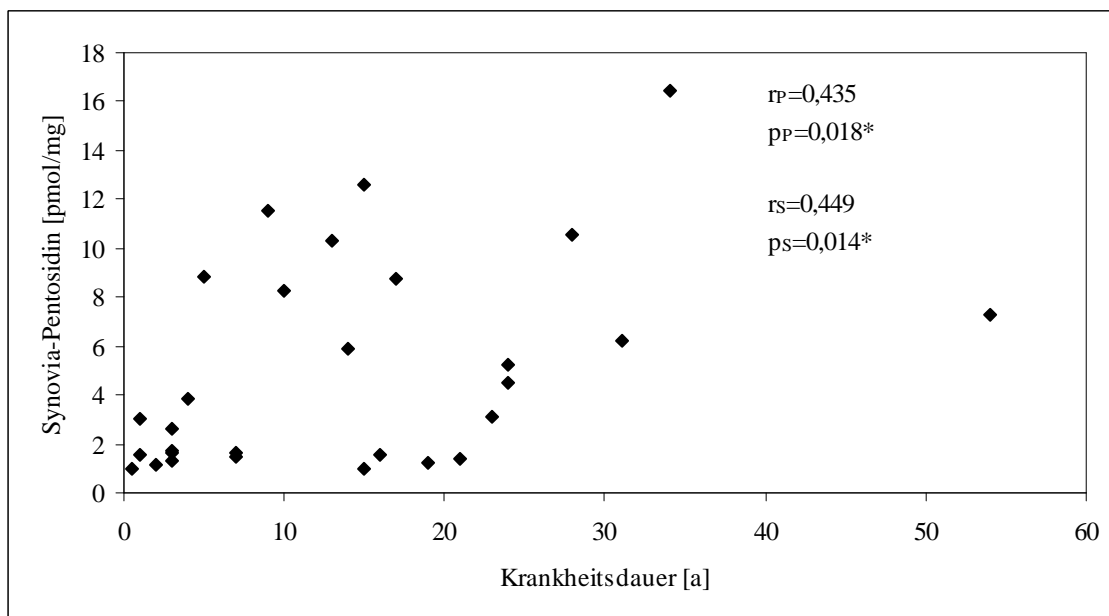


Abb. 5.15 Korrelation zwischen Krankheitsdauer und Synovia-Pentosidin-Spiegel bei Patienten mit RA

Hingegen korreliert das Alter weder nach Pearson ($r_P = 0,091$ mit $p_P = 0,634$) noch nach Spearman ($r_S = 0,113$ mit $p_S = 0,552$) mit dem Pentosidin-Spiegel in der Synovia.

Für den Serum-Pentosidin-Spiegel waren keinerlei signifikante Korrelationen bezüglich Krankheitsdauer oder Alter nachweisbar. Dies gilt auch für die CML-Spiegel, insbesondere das Synovia-CML korreliert weder mit der Krankheitsdauer noch mit dem Alter. (Tab 5.9)

5.2.3 Abhängigkeit des Pentosidin und CML vom Gelenkdestruktionsgrad

Die Gelenkdestruktion wurde anhand des erreichten Röntgenstadiums nach Steinbrocker zum Zeitpunkt der Entnahme der Serum- bzw. Synovia-Proben beurteilt. Da nur 3 Serum-Proben bzw. 1 Synovia-Probe von Patienten mit dem Röntgenstadium 0 zur Verfügung standen, bleibt dieses Röntgenstadium im Folgenden unberücksichtigt.

Der Serum-Pentosidin-Spiegel steigt mit zunehmendem Röntgenstadium leicht an, wobei dieser Anstieg in höheren Röntgenstadien geringer ist. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Röntgenstadien konnten allerdings nicht gefunden werden. (Abb. 5.16, Tab. 5.8)

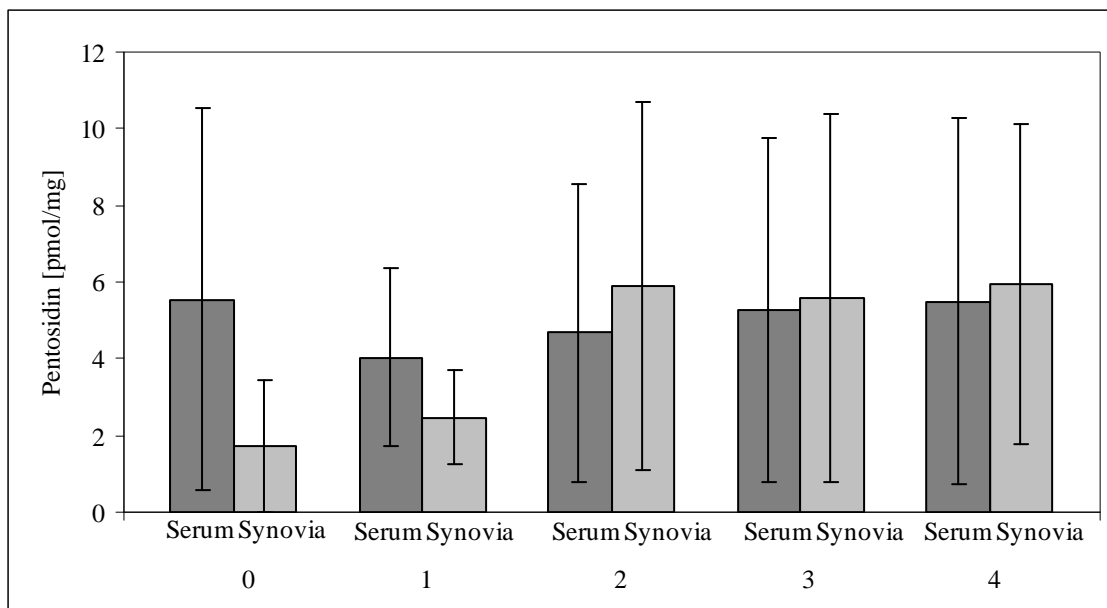


Abb. 5.16 Vergleich der Pentosidin-Spiegel in Serum und Synovia in Abhängigkeit vom erreichten Röntgenstadium bei Patienten mit RA (Mittelwert \pm Standardabweichung)

In höheren Röntgenstadien (ab Röntgenstadium 2) sind auch höhere Synovia-Pentosidin-Spiegel zu verzeichnen als im Röntgenstadium 1. Da die Gruppengröße für die einzelnen Stadien sehr gering ist, woraus eine extrem große Standardabweichung resultiert, waren keinerlei signifikante Unterschiede nachweisbar.

Weiterhin soll noch erwähnt werden, dass ab Röntgenstadium 2 die Synovia-Pentosidin-Spiegel höhere Werte erreichen als die dazugehörigen Serum-Pentosidin-Spiegel, allerdings nicht signifikant.

Auch die Serum-CML-Spiegel erhöhen sich leicht mit dem zunehmendem Röntgenstadium. Die Synovia-CML-Spiegel sind immer geringer als die dazugehörigen Serum-CML-Spiegel und haben ihre niedrigsten Werte beim Röntgenstadium 3. Auch diese Angaben besitzen keine statistische Sicherheit (Abb. 5.17, Tab. 5.8).

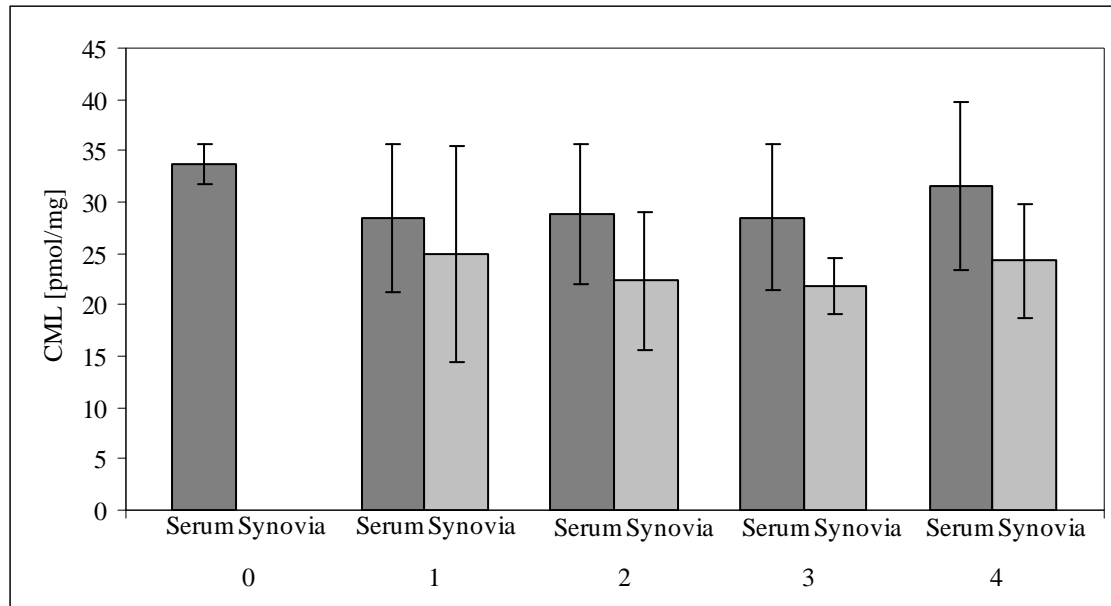


Abb. 5.17 Vergleich der CML-Spiegel in Serum und Synovia in Abhängigkeit vom erreichten Röntgenstadium bei Patienten mit RA (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Pentosidin- und CML-Spiegel bei RA in Abhängigkeit vom Röntgenstadium					
Röntgenstadium	0	1	2	3	4
Serum-Pentosidin	3 5,54 \pm 4,99	14 4,03 \pm 2,31	26 4,67 \pm 3,90	24 5,25 \pm 4,50	17 5,50 \pm 4,78
Synovia-Pentosidin	1 1,71	4 2,47 \pm 1,21	10 5,91 \pm 4,79	8 5,58 \pm 4,80	5 5,95 \pm 4,16
Serum-CML	3 33,73 \pm 1,90	14 28,47 \pm 7,22	26 28,83 \pm 6,75	24 28,53 \pm 7,08	17 31,61 \pm 8,16
Synovia-CML	keine Fälle	4 24,96 \pm 10,54	8 22,40 \pm 6,72	2 21,80 \pm 2,69	3 24,31 \pm 5,52

Tab. 5.8 Übersicht über die Pentosidin- als auch -CML-Spiegel in Serum und Synovia bei Patienten mit einer RA in Abhängigkeit vom Röntgenstadium (Pentosidin-Spiegel in pmol/mg, CML-Spiegel in pmol/mg; Mittelwert \pm Standardabweichung, darüber Anzahl der zugrunde liegenden Probanden)

5.2.4 Abhängigkeit des Pentosidin und CML von der entzündlichen Aktivität

Die entzündliche Aktivität der Erkrankung wurde an Hand der Blutsenkungsgeschwindigkeit und des C-reaktiven-Proteins als systemische Parameter, sowie mittels der Synovia-Zellzahl in Gelenkpunktaten als lokaler Parameter, bestimmt.

Das Serum-Pentosidin korreliert nach Spearman mit der BSG ($r_s=0,189$ mit $p_s=0,034$) (Abb. 5.18) und dem CrP ($r_s=0,179$ mit $p_s=0,048$) (Abb. 5.19) signifikant. Sonst konnten keinerlei signifikante Korrelationsfaktoren weder nach Spearman noch nach Pearson nachgewiesen werden. (Tab 5.9)

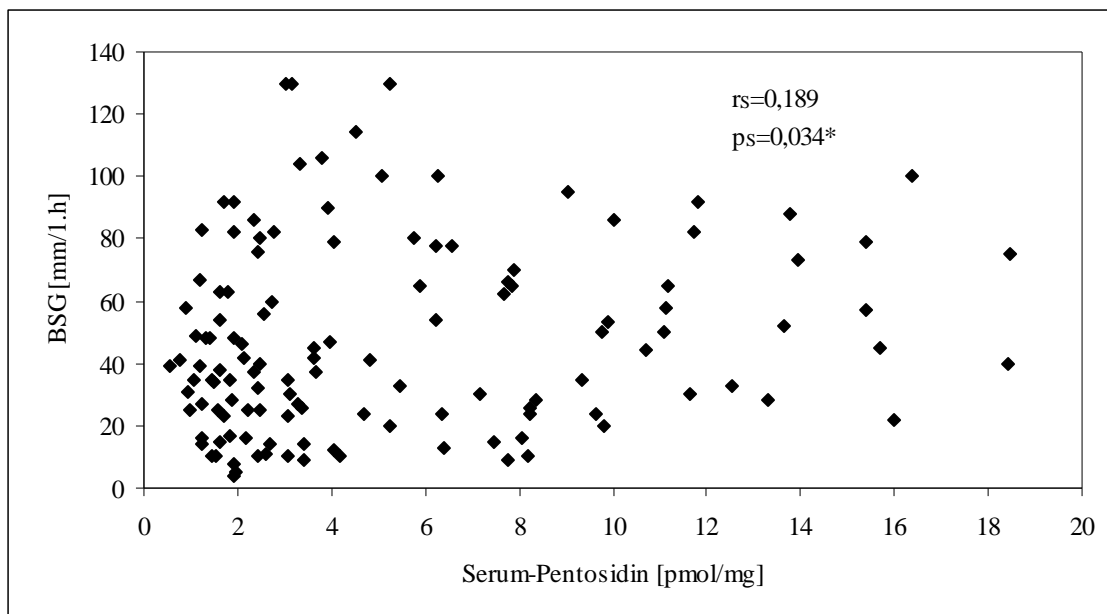


Abb. 5.18 Korrelation zwischen Serum-Pentosidin-Spiegel und BSG bei Patienten mit RA

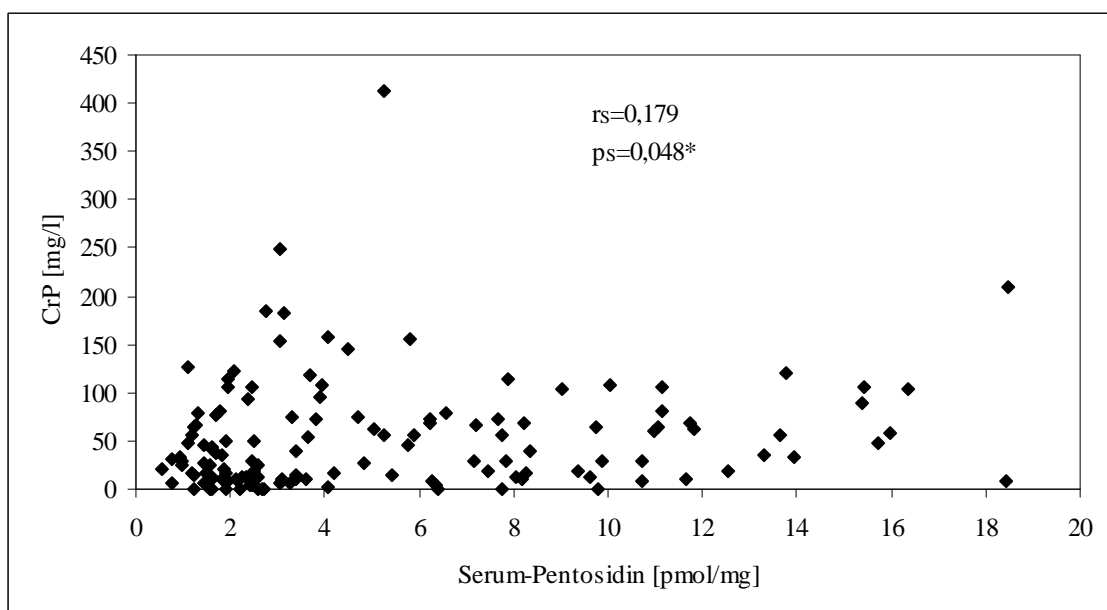


Abb. 5.19 Korrelation zwischen Serum-Pentosidin-Spiegel und CrP bei Patienten mit RA

5.2.5 Abhängigkeit des Pentosidin und CML vom Rheumafaktor

Es wurden die Serum- und Synovia-Spiegel von Pentosidin und CML mit den nephelometrisch bestimmten Rheumafaktoren verglichen. Es fanden sich signifikante Korrelationen nach Peareson zwischen den Serum-CML ($r_P=0,305$ mit $p_P=0,013$) als auch Synovia-CML ($r_P=0,647$ mit $p_P=0,007$) und dem Rheumafaktor (Abb. 5.20, Abb. 5.21). Eine signifikante Korrelation nach Spearman konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Auch ein Zusammenhang zwischen dem Rheumafaktor und den Pentosidin-Spiegeln war nicht zu beweisen. (Tab 5.9)

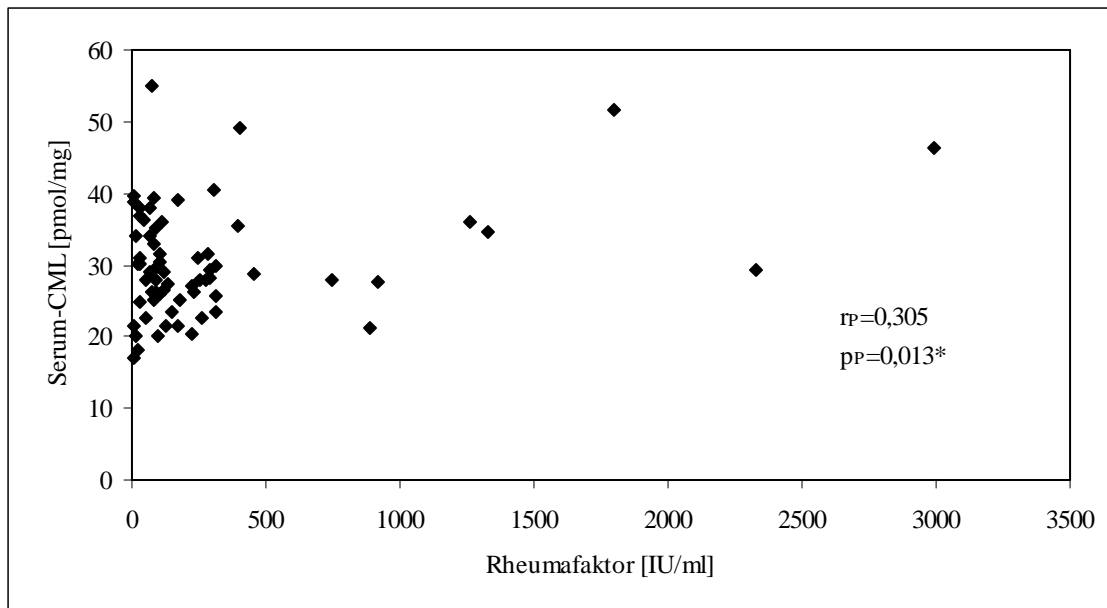


Abb. 5.20 Korrelation zwischen Serum-CML und dem Rheumafaktor bei RA-Patienten

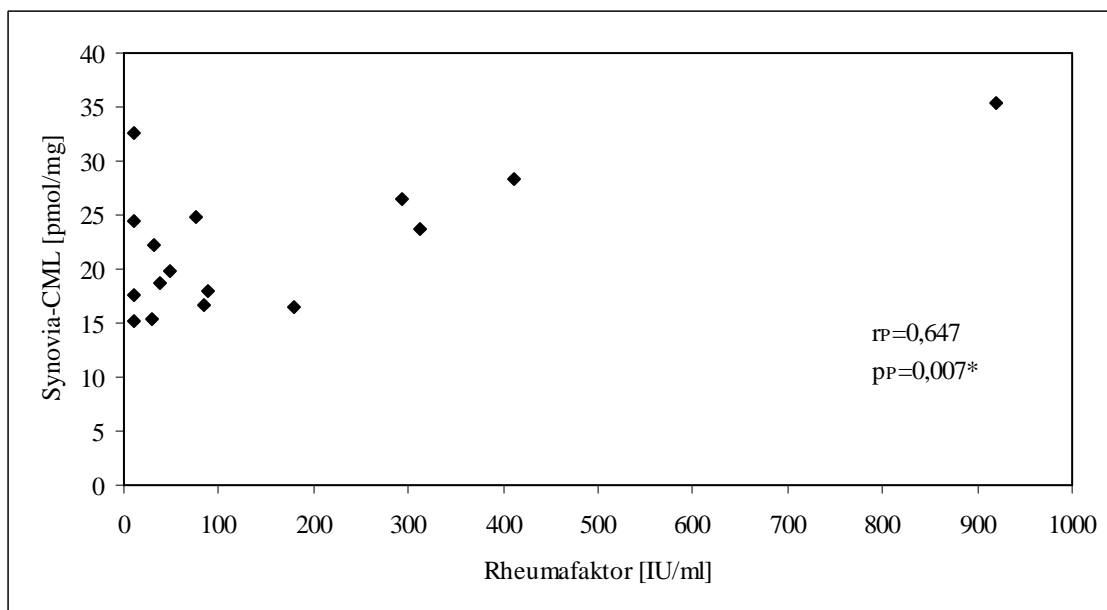


Abb. 5.21 Korrelation zwischen Synovia-CML und dem Rheumafaktor bei RA-Patienten

Übersicht der Korrelationen bei RA				
	Serum-Pentosidin	Synovia-Pentosidin	Serum-CML	Synovia-CML
Alter	N=133	N=30	N=133	N=19
	$r_P=0,161$ $p_P=0,064$	$r_P=0,091$ $p_P=0,634$	$r_P=0,099$ $p_P=0,259$	$r_P=0,161$ $p_P=0,510$
	$r_S=0,159$ $p_S=0,067$	$r_S=0,113$ $p_S=0,552$	$r_S=0,128$ $p_S=0,144$	$r_S=0,137$ $p_S=0,577$
Krankheitsdauer	N=127	N=29	N=127	N=18
	$r_P=0,113$ $p_P=0,206$	$r_P=0,435$ $p_P=0,018^*$	$r_P=-0,058$ $p_P=0,516$	$r_P=0,126$ $p_P=0,618$
	$r_S=-0,055$ $p_S=0,539$	$r_S=0,449$ $p_S=0,014^*$	$r_S=-0,065$ $p_S=0,470$	$r_S=0,177$ $p_S=0,482$
BSG	N=126	N=21	N=126	N=17
	$r_P=0,172$ $p_P=0,054$	$r_P=0,049$ $p_P=0,831$	$r_P=-0,132$ $p_P=0,139$	$r_P=-0,139$ $p_P=0,594$
	$r_S=0,189$ $p_S=0,034^*$	$r_S=-0,050$ $p_S=0,829$	$r_S=-0,172$ $p_S=0,054$	$r_S=-0,222$ $p_S=0,392$
CrP	N=122	N=23	N=122	N=15
	$r_P=0,123$ $p_P=0,178$	$r_P=0,042$ $p_P=0,850$	$r_P=-0,154$ $p_P=0,090$	$r_P=-0,109$ $p_P=0,698$
	$r_S=0,179$ $p_S=0,048^*$	$r_S=0,063$ $p_S=0,774$	$r_S=-0,154$ $p_S=0,091$	$r_S=-0,207$ $p_S=0,459$
Synoviazellzahl	N=20	N=23	N=20	N=17
	$r_P=0,415$ $p_P=0,069$	$r_P=-0,057$ $p_P=0,796$	$r_P=0,154$ $p_P=0,517$	$r_P=-0,311$ $p_P=0,225$
	$r_S=0,208$ $p_S=0,379$	$r_S=-0,163$ $p_S=0,457$	$r_S=0,025$ $p_S=0,917$	$r_S=-0,407$ $p_S=0,105$
Rheumafaktor (nephelometrisch)	N=66	N=22	N=66	N=16
	$r_P=0,119$ $p_P=0,340$	$r_P=0,351$ $p_P=0,109$	$r_P=0,305$ $p_P=0,013^*$	$r_P=0,647$ $p_P=0,007^*$
	$r_S=0,231$ $p_S=0,062$	$r_S=0,295$ $p_S=0,182$	$r_S=0,062$ $p_S=0,624$	$r_S=0,365$ $p_S=0,165$

Tab. 5.9 Übersicht der Korrelationen zwischen Alter, Krankheitsdauer, BSG, CrP, Synoviazellzahl und nephelometrisch bestimmten Rheumafaktor mit den Pentosidin- und CML-Spiegeln in Serum und Synovia von RA-Patienten (N Anzahl der in der Korrelation berücksichtigten Patienten; r_P Korrelationsfaktor nach Pearson, p_P dazugehörige Signifikanz, r_S Korrelationsfaktor nach Spearman, p_S dazugehörige Signifikanz; signifikante Ergebnisse sind fettgedruckt hervorgehoben und mit einem * gekennzeichnet)

6 DISKUSSION

6.1 Bedeutung der AGEs

Die AGE-modifizierten Proteine und die AGEs, nach deren lysosomaler Freisetzung selbst, sind eine Klasse chemischer Verbindungen mit einem erheblichen pathogenetischen Potential. Vermittelt wird dieses Potential über Beeinflussung des Redoxzustandes des Gewebes, d.h. Entstehung von oxidativem Stress, durch Erzeugung einer Dysbalance verschiedener proinflammatorischer Zytokine und durch pathologische Quervernetzung von Proteinen, die darüber hinaus auch immunogen sein können. (Wisotzky et al. 1996, Bierhaus et al. 1998, Nawroth et al. 1999, Singh et al. 2001)

Hierbei sind zwei Mechanismen von Bedeutung (Nawroth et al. 1999). Der erste ist die Entstehung von pathogenen Sauerstoffradikalen. Dieser Prozess läuft rein chemisch, zum Teil enzymatisch katalysiert, extrazellulär ab. Hierbei wird Glucose Metall-katalysiert aktiviert, wobei als wichtige Nebenprodukte Superoxidradikale entstehen.

Der zweite Mechanismus verläuft intrazellulär, erfordert folglich die Signaltransduktion der AGEs, die die RAGE über eine lang anhaltende Aktivierung vermitteln. Folge der AGE-Bindung an die RAGE ist intrazellulärer oxidativer Stress. Dies führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB, eines wichtigen Regulatorproteins für die Transkription von Zytokinen, Adhäsionsmolekülen, Rezeptoren von Gerinnungsfaktoren und Endothelin-1. Damit greifen die AGEs in einen sehr zentralen Mechanismus der Inflammation ein.

Über das NFκB wirken umgekehrt auch die Glucocorticoide, sehr wichtige Medikamente unter anderem zur Therapie eines akuten Schubes chronisch-entzündlicher Erkrankungen (Bamberger und Schulte 1997, Auphan et al. 1995, Scheinman et al. 1995). Diese Formulierung ist ganz bewusst so allgemein gehalten, um zu demonstrieren, wie zentral und allgemein der NFκB-Mechanismus und damit auch ein möglicher Einfluss der AGEs ist.

Beispiele für die therapeutische Anwendung der Glucocorticoide sind der akute Schub der RA, des systemischen Lupus erythematosus, des Morbus Crohn, der Colitis ulcerosa, mancher Glomerulonephritiden und anderer chronisch-entzündlicher Erkrankungen. Ob es auch bei all diesen Erkrankungen zu einer AGE-abhängigen NFκB-Aktivierung kommt, ist aber bisher nicht erwiesen. Zum Teil sind auch nur einzelne Komponenten des AGE-Konzeptes beteiligt. Beispielsweise bindet das proinflammatorische Zytokin S100A12 an den AGE-Rezeptor ohne unmittelbare Gegenwart von AGEs und kann damit zu einer RAGE-vermittelten NFκB-Aktivierung führen. Andererseits kann auch eine Veränderung der Extrazellulärmatrix durch AGE-Modifikationen zur Pathogenese von unterschiedlichen Erkrankungen beitragen.

(Takahashi et al. 1997, Rodriguez-Garcia et al. 1998, Miyata et al. 1998, Chen et al. 1999, Drinda et al. 2002, Foell et al. 2003a, Tanji et al. 2000, Peruzzi et al. 2000).

Die „klassischen“ AGE-Erkrankungen, also die Erkrankungen bei denen die Akkumulation von AGEs am längsten bekannt bzw. am intensivsten erforscht wurde, sind der Diabetes mellitus und die chronische Niereninsuffizienz. Bei ihnen finden sich übernormale AGE-Spiegel sowohl wegen erhöhter Bildungsrate als auch verminderter renaler Ausscheidung. Die AGE-modifizierten Proteine werden mit verschiedenen krankheitstypischen Komplikationen in Zusammenhang gebracht (Nawroth et al. 1999, Wisotzky et al. 1996).

Kardiovaskuläre Komplikationen, Erkrankungen mit erheblicher persönlicher aber auch gesellschaftlicher Bedeutung, werden im Rahmen einer durch AGEs akzelerierten Arteriosklerose gesehen. Pathogenetisch gibt es mindestens zwei Ansatzpunkte. Zum einen fördert AGE-modifiziertes LDL besonders die Atherosklerose (Makita et al. 1996), zum anderen verschlimmern die AGEs vermittelt über RAGE die Atherosklerose. Folge der AGE-RAGE-Interaktion ist die Entstehung von oxidativem Stress, der zu einer Expression von Adhäsionsmolekülen an der Oberfläche der Endothelzellen führt. Dadurch wandern Entzündungszellen in die Gefäßwand ein, es entsteht eine Gefäßwandentzündung (Hori et al. 1996, Basta et al. 2002).

Da der Diabetes mellitus und die chronische Niereninsuffizienz Krankheiten mit erhöhten AGE-Spiegeln sind, erklärt sich auch hieraus die erhöhte Prävalenz von Myokardinfarkten, Apoplexen und peripher-arteriellen Verschlusskrankheiten bei diesen Erkrankungen (Friedman 1999b, Ritz et al. 1994).

Da auch bei der RA erhöhte AGE-Spiegel, wie in dieser Arbeit gezeigt, vorliegen, wäre zu schlussfolgern, dass auch bei diesen Patienten gehäuft kardiovaskuläre Komplikationen auftreten. Dies wurde auch beobachtet, wenn gleich es hier ursächliche Überlappungen mit einer Vasculitis gibt. Die AGE-Beteiligung wurde nicht explizit untersucht. (Bacon et al. 2002, Del Rincon et al. 2003)

Es ließen sich noch mehr Beispiele dafür anführen, wie erhöhte AGE-Spiegel die Pathogenese von krankheitsspezifischen Komplikationen beeinflussen.

AGE-modifizierte Proteine entstehen nicht nur unter pathologischen Bedingungen, sondern akkumulieren ganz physiologisch mit dem Lebensalter (Baynes 2001). Hierbei sind vor allem langlebige Proteine gefährdet, wie zum Beispiel das Kollagen. Es konnte gezeigt werden, dass das Kollagen im Gelenkknorpel glyciert wird. Dieser AGE-modifizierte Knorpel verändert ganz wesentlich seine Eigenschaften. Er wird spröde, zeigt eine verminderte Elastizität, Dehnbarkeit und Festigkeit. Zusätzlich bewirken die AGEs auch einen gesteigerten Proteoglycan-

Abbau, eine verminderte Proteoglycan-Synthese und eine erhöhte Vulnerabilität der Extrazellulärmatrix gegen Metalloproteinasen.

Die verminderte Widerstandsfähigkeit des Knorpels gegenüber äußeren Kräften und die veränderten Stoffwechselprozesse münden in einer Arthrose. (Verzijl et al. 2002, DeGroot et al. 2001, DeGroot et al. 1999, Gibson et al. 2001, Schwab et al. 2002, Saudek und Kay 2003) AGE-modifiziertes Kollagen wurde auch im Knochen gefunden. Diese AGEs haben einen komplexen Einfluss auf das Remodelling des Knochens. Hierbei ist besonders das AGE Pentosidin von pathologischer Bedeutung. Das CML könnte sogar einen günstigen Effekt durch die Hemmung der Osteoklasten haben. Das AGE-Konzept leistet also auch einen Beitrag zur Pathogenese der Osteoporose (Hein et al. 2003, Miyata et al. 1997a, Miyata et al. 1996c).

Bei einer Arthritis ist eine der ersten röntgenologisch nachweisbaren Veränderungen die gelenknahe Osteoporose. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, finden sich bei einer RA erhöhte Pentosidin-Spiegel. Da die Gelenke die Hauptmanifestationsorte dieser Erkrankung sind, liegt nahe, dass dort auch der höchste oxidative Stress und damit die ausgeprägteste AGE-Bildungsrate zu finden ist. Dies könnte über eine Pentosidin-abhängige Aktivierung der Osteoklasten (Miyata et al. 1997a) die lokale Osteoporose bei RA bzw. allgemein bei einer Arthritis erklären. Bewiesen ist diese Hypothese aber noch nicht.

AGE-Modifikationen wurden noch bei sehr vielen anderen Erkrankungen aus unterschiedlichen Fachbereichen, z.B. Neurologie, Psychiatrie, Ophthalmologie oder Dermatologie gefunden (Colaco et al. 1996, Bar et al. 2003, Castellani et al. 1996, Argirova und Breipohl 2002, Ahmed et al. 1997, Dawczynski et al. 2002, Dunn et al. 1991). Die obengenannten Ausführungen zum Auftreten von AGEs erheben keinen Anspruch auf Vollständigkeit, sondern sollen nur demonstrieren, dass das AGE-Konzept ein sehr universelles ist, bei dem unterschiedliche Aspekte in die Erklärung pathogenetischer Abläufe einfließen.

Eine wichtige Frage ist auch, ob man das AGE-Konzept unmittelbar für den Patienten nutzbar machen kann, z.B. für die Entwicklung von Medikamenten, die den Circulus vitiosus aus AGE-Bildung und oxidativem Stress durchbrechen können. Da sich die AGE-Wirkung vorrangig über das NFκB erklärt (Nawroth et al. 1999, Bierhaus et al. 1998), wäre es denkbar, dass man ähnlich wirksame Medikamente, wie die Glucocorticoide, die ja auch zum Teil über eine NFκB-Hemmung wirken, findet. Ideal wäre ein günstigeres Nebenwirkungsprofil.

Konkrete Ansätze gibt es aber derzeit noch nicht. Es existieren nur Erfahrungen zur Prävention diabetischer Folgeerkrankungen (Singh et al. 2001).

6.2 RA und AGEs

6.2.1 Vergleich RA mit anderen Gelenkkrankheiten und Gesunden

Die RA ist eine Erkrankung, bei der oxidativer Stress nachgewiesen wurde (Hassan et al. 2001, Mulherin et al. 1996, Bashir et al. 1993). Somit ist die Bildung von AGEs begünstigt. Es stellt sich die Frage, in welchem Ausmaß sind AGEs bei der RA nachweisbar und unterscheidet sich diese Ausprägung von ähnlich gearteten Erkrankungen?

Zu diesem Zweck wurden in den eigenen Untersuchungen Pentosidin- und CML-Spiegel in Serum und Synovia bei RA-Patienten verglichen mit den Spiegeln dieser AGEs von Arthrose- und SpA-Patienten sowie gesunden Vergleichspersonen.

Die höchsten Serum-Pentosidin-Spiegel erreichten die RA-Patienten. Die zweithöchsten wiesen die Arthrose-Patienten auf, dann folgten die SpA-Patienten. Die niedrigsten Spiegel fanden sich bei den Gesunden. Die Synovia-Spiegel verhielten sich genauso. Im Vergleich zu den Serum-Spiegeln waren die Synovia-Spiegel jeweils geringer. Die Gesunden konnten mangels Synovia-Proben beim Vergleich der Spiegel in der Gelenkflüssigkeit nicht berücksichtigt werden.

Die Serum-CML-Spiegel wiesen nahezu gleiche Werte auf. Hier fanden sich sogar bei den gesunden Vergleichsprobanden die diskret höheren Werte. Die Synovia-CML-Spiegel der RA- und SpA-Patienten erreichten ein gleiches Niveau, geringere Spiegel fanden sich in der Synovia der Arthrose-Patienten. Auch hier lagen die Serum-Spiegel immer oberhalb der Synovia-Spiegel.

Da bis auf den Vergleich der RA-Patienten mit den Arthrose-Patienten bei allen anderen Vergleichen ein signifikanter Altersunterschied bestand, erscheint eine statistische Beurteilung ohne Eliminierung des Störfaktors Alter nicht sinnvoll.

Zum Vergleich der RA-Patienten mit den Arthrose-Patienten: Hier bestand in der Gesamtprobandengruppe Altersgleichheit. Es fanden sich tendenziell höhere Serum- und Synovia-Pentosidin-Spiegel bei den RA-Patienten ohne Signifikanz. Die Serum-CML-Spiegel waren bei beiden Gruppen nahezu gleich, nur der Synovia-CML-Spiegel war bei den Arthrose-Patienten geringer, allerdings auch nicht statistisch signifikant.

Insgesamt konnte festgestellt werden, dass sich bei dem Vergleich der RA-Patienten mit den Arthrose-Patienten Unterschiede andeuten, diese ließen sich aber statistisch nicht sichern.

Die RA stellt eine primär entzündliche Erkrankung dar, das heißt, die Entzündung ist ein wesentlicher pathogenetischer Teilfaktor. Dies ist ein entscheidender Unterschied zur Arthrose, die primär degenerativer Natur ist. Bei der RA ist also intensiver oxidativer Stress

zu erwarten, was eine Erklärungsmöglichkeit der höheren Pentosidin-Spiegel in Serum und Synovia sein könnte.

Allerdings zeigen auch die Arthrose-Patienten höhere Serum-Pentosidin-Spiegel im altersangepassten Vergleich mit den Gesunden, wenn auch nicht statistisch signifikant. Folglich muss es auch bei den Arthrose-Patienten Bedingungen geben, die zur verstärkten Pentosidin-Bildung führen. Auch bei einer Arthrose kommt es immer wieder zu einer Synovialitis, zu einer aktivierten Arthrose, also auch eines Zustandes bei dem oxidativer Stress mit daraus resultierender AGE-Bildung zu vermuteten ist. Infolgedessen kommt es zu einer übernormalen Akkumulation der AGEs.

Eine weitere Erklärung für die erhöhten Pentosidin-Spiegel bei Arthrose könnte der Befund liefern, dass AGE-modifiziertes Kollagen im Gelenkknorpel des Patienten, diesen besonders anfällig macht für eine Degeneration (Verzijl et al. 2002, DeGroot et al. 2001, DeGroot et al. 1999, Gibson et al. 2001). Das heißt, dass bei diesen Patienten auch ohne Synovialitis mehr AGE-modifizierte Proteine vorhanden sind, welche dann auch in der Synovia und im Serum nachweisbar werden.

Das Synovia-CML ist bei Arthrose-Patienten geringer als bei RA-Patienten, aber nicht signifikant, wobei die RA- und SpA-Patienten, also primär entzündliche Erkrankungen, gleiche Synovia-CML-Spiegel erreichen. Dieser Unterschied findet sich nicht im Serum, wo bei allen drei Erkrankungen annähernd gleiche CML-Spiegel ermittelt wurden. Der erniedrigte Synovia-CML-Spiegel bei Arthrose-Patienten könnte auf differente Bildungs- oder Bindungsprozesse des CML im Gelenk bei Arthrosen im Unterschied zu RA und SpA hinweisen. Da diesem Unterschied aber die Signifikanz fehlt, bedarf es weiterer Untersuchungen um diese Hypothese zu beweisen oder zu widerlegen.

Vergleicht man die Pentosidin-Spiegel von RA-Patienten mit denen von SpA-Patienten, finden sich nach Alterskorrektur bei der RA höhere Spiegel im Serum als auch in der Synovia. Signifikant ist dieser Unterschied aber nur für den Serum-Vergleich. Beide Erkrankungen sind entzündlicher Natur, wenn gleich die RA wesentlich aggressiver und zerstörerischer verläuft. Es lässt sich also auch hier ein ausgeprägter oxidativer Stress vermuten, der sich in einem deutlich höheren Serum-Pentosidin widerspiegelt. Möglich erscheint aber auch ein höherer Anteil pathogener Quervernetzungen des Kollagens oder anderer Strukturproteine bei der RA.

Problematisch ist dieser Vergleich allerdings deshalb, weil die Gruppe der SpA-Patienten eine sehr heterogene ist. Ihr wurden Patienten mit unterschiedlichen Erkrankungen zugeordnet. Hier finden sich Patienten, die an einer Spondylitis ankylosans, einer Psoriasis-Arthritis, einer

reaktiven Arthritis, einer Arthritis bei chronischer Darmerkrankung und einer Oligoarthritis unklarer Genese litten. Es ist vorstellbar, dass auch die „Nebenerkrankungen“, z.B. die Psoriasis oder die chronisch-entzündliche Darmerkrankung die Pentosidin-Spiegel beeinflussen. Ein Vergleich der Serum-Pentosidin-Spiegel dieser Gruppe mit den Gesunden zeigt zwar einen gering erhöhten Spiegel, dieser Unterschied ist aber nicht statistisch gesichert, so dass hier ein Einfluss der Grunderkrankung als auch der Arthritis unwahrscheinlich ist. Ein weiterer modifizierender Faktor ist das Alter der SpA-Patienten. Es sind relativ junge Patienten mit einem Durchschnittsalter von 39 ± 15 Jahren. Durch die Alterskorrektur ist der Störfaktor Alter zwar eliminiert worden, es ist aber vorstellbar, dass bei insgesamt älteren Probanden Unterschiede deutlicher werden, da mehr Zeit zur AGE-Akkumulation verstrichen ist.

Da allerdings auch bei diesen jungen Probanden ein signifikanter Unterschied beim Serum-Pentosidin zwischen RA und SpA besteht, wird deutlich, dass die Bedingungen, unter denen Pentosidin entsteht bei der RA besonders ausgeprägt sind. Eine wichtige Bedingung ist ja der oxidative Stress. Da auch bei der SpA eine Arthritis vorliegt, wo man oxidativen Stress vermuten kann, wird zum einen deutlich, um wieviel stärker der oxidative Stress bei der RA ist. Aber auch eine systemische Komponente wird hier wahrscheinlich.

Bezüglich der CML-Spiegel im Serum und in der Synovia fanden sich keinerlei Unterschiede. Es wurde ein identisches Niveau erreicht. Es ist zu schlussfolgern, dass Pentosidin und CML unter verschiedenen Bedingungen entstehen. Zum einen sind die glycierten Aminosäuren wichtig, zum anderen auch die an der Entstehung des oxidativen Milieus beteiligten Substanzen. So wurde gezeigt, dass bei RA-Patienten das Verhältnis von Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure zu Gunsten der Dehydroascorbinsäure verändert ist (Lunec und Blake 1985). Die Dehydroascorbinsäure wird aber gleichzeitig als Precursor für Pentosidin angesehen (Nagaraj et al. 1991). Es zeigt sich, dass die Bildung der AGEs von vielen Faktoren beeinflusst wird, die nicht nur die Höhe der AGE-Spiegel bestimmen sondern auch die Art des AGEs.

Der Serum-Pentosidin-Spiegel bei RA-Patienten ist signifikant höher als bei den Gesunden. Dies stützt die Hypothese, dass der oxidative Stress eine wesentliche Ursache für die Bildung von AGEs, insbesondere von Pentosidin, ist. Hingegen fand sich der CML-Spiegel bei gesunden Vergleichsprobanden signifikant höher als bei RA-Patienten. Dies widerspricht der Hypothese. Offensichtlich unterliegen die verschiedenen AGE-Verbindungen differenten Bindungsmechanismen oder -bedingungen bzw. einem unterschiedlichen weiterführenden Metabolismus.

In den vorangegangenen Überlegungen wurde vermutet, dass für die Erhöhung der AGEs, insbesondere des Pentosidins, der ausgeprägte oxidative Stress ursächlich ist. Die AGEs haben aber auch ein immunogenes Potential. Sie könnten möglicherweise das Auto-Antigen darstellen, welches zur T-Lymphozytenaktivierung führt, die am Beginn der Pathogenese der RA steht. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass nur die RA-Patienten im Vergleich mit den Gesunden signifikant erhöhte Serum-Pentosidin-Spiegel zeigten. Unter Umständen stellt der erhöhte Serum-Pentosidin-Spiegel das ätiologische Korrelat der RA dar.

Auch anderweitige Untersuchungen, die sich mit den AGE-Spiegeln bei RA-Patienten befassen, wiesen signifikant höhere Pentosidin-Spiegel im Serum bzw. im Plasma im Vergleich zu Gesunden nach (Takahashi et al. 1997, Rodriguez-Garcia et al. 1998, Miyata et al. 1998).

Bei dem Vergleich der Serum- und Synovia-Pentosidin-Spiegel zwischen RA-Patienten und Arthrose-Patienten deuteten sich in der vorliegenden Untersuchung zwar Unterschiede an, insbesondere für das Serum-Pentosidin, konnten aber nicht als signifikant nachgewiesen werden. Der Synovia-Vergleich bestätigt die Ergebnisse von Chen et al. 1998. Signifikant erhöhte Pentosidin-Spiegel in beiden Körperflüssigkeiten bei RA-Patienten gegenüber Arthrose fanden sich aber in anderen Untersuchungen (Miyata et al. 1998: Vergleich der Plasma-Spiegel; Chen et al. 1999). Ein Grund für diese Diskrepanz könnte besonders bei dem Synovia-Vergleich die geringe Patientenzahl, aber auch methodische Unterschiede bei der Synovia-Proteinbestimmung sein. Beim Vergleich der Serum-Spiegel ging allerdings eine vergleichbare Anzahl Probanden ein, hier wurde der signifikante Unterschied auch nur knapp verfehlt.

Untersuchungen, die sich mit dem Pentosidin-Spiegel von SpA befassen, existieren nicht. Es wurde lediglich anhand einer RAGE-Stimulation über das Calcium-bindende Protein S100A12 gezeigt, dass auch hier das AGE-Konzept Bedeutung erlangen könnte, insbesondere bei einer Psoriasis-Arthritis, aber auch bei der RA. Das S100A12 wird von aktivierten Granulozyten sezerniert und bindet an die Rezeptoren für AGEs (RAGE). Die Folge ist eine NFκ-abhängige Aktivierung des Endothels, die auch zur Ausbildung einer Synovitis beiträgt. Ob und wie die AGEs und das S100A12 interagieren ist derzeit noch unklar. (Foell et al. 2003b)

Über CML-Spiegel im Serum und Synovia bei Gelenkerkrankungen existieren keine veröffentlichten Untersuchungen. Beschäftigt haben sich aber Arbeitsgruppen mit der immunhistochemischen Lokalisation von CML in der Synovia. So zeigte Drinda, aus der eigenen Arbeitsgruppe, (Drinda et al. 2001) bei RA- und Arthrose-Patienten eine gehäufte

Ablagerung an der synovialen Grenzfläche und an Gefäßendothelien. Diese war bei RA-Patienten wesentlich ausgeprägter als bei Arthrose-Patienten. Die Gesunden wiesen nur geringe CML-Vorkommen ausschließlich an Gefäßendothelien auf. Bei der RA konnte CML auch in Makrophagen und T-Lymphozyten lokalisiert werden. In einer weiteren Untersuchung wurde gezeigt, dass sich bei Arthrose-Patienten ebenso CML im Zytoplasma von Chondrozyten finden lässt (Schwab et al. 2002).

Wie die oben genannten Untersuchungen gezeigt haben, kommt es bei einer RA und auch bei einer Arthrose zu einer vermehrten CML-Bindung in der Synovia. Dies könnte die signifikant niedrigeren CML-Spiegel im Serum von RA-Patienten gegenüber Gesunden erklären. Das gebundene CML fehlt in der Zirkulation. Drinda et al. 2001 demonstrierte eine ausgeprägtere Ablagerung bei der RA gegenüber der Arthrose. Es muss also bei den Synovia-CML-Spiegeln weniger eine verminderte Bildungsrate als vielmehr eine erhöhte Bindungsrate diskutiert werden.

Die niedrigen CML-Spiegel in der Synovia von Arthrose-Patienten lassen sich nicht zweifelsfrei deuten. Aufgrund der geringen Patientenzahl ist dieses Ergebnis allerdings auch nicht signifikant.

6.2.2 Zusammenhang von klinischen sowie paraklinischen Kriterien und AGEs bei RA

Der Serum-Spiegel von Pentosidin als auch CML korreliert mit dem dazugehörigen Synovia-Spiegel. Dies bestätigen für das Pentosidin Miyata et al. 1998 als auch Chen et al. 1999. Für das CML liegen keine entsprechenden Untersuchungen vor.

Die Korrelation erscheint für das Pentosidin strenger zu sein, das heißt, es liegt ein signifikanter linearer Zusammenhang vor. Für das CML sind zwar der Pearson- als auch der Spearman-Korrelationsfaktor signifikant, aber sie unterscheiden sich in der Qualität. Hier erscheint der Spearman-Korrelationsfaktor deutlich strenger, in der Größenordnung vergleichbar mit den ermittelten Faktoren für Pentosidin. Das Synovia-CML steht in einem Zusammenhang mit den Serum-CML, aber möglicherweise liegt hier ein nicht-lineares Verhältnis vor.

Die Serum-Spiegel für Pentosidin und CML waren höher als die Synovia-Spiegel. Signifikant war dieser Unterschied aber nur für das CML. Beim Pentosidin-Vergleich wurde eine Signifikanz nicht erreicht. Chen et al. 1999 fand ebenfalls höhere Pentosidin-Spiegel im Serum gegenüber der Synovia. Auch hier war der Unterschied nicht signifikant. Chen et al. 1999 erklärte den niedrigeren Synovia-Pentosidin-Spiegel mit Hilfe eines geringen Proteinanteils in der Synovia, der zum einen durch einen höheren Verbrauch erklärt wird, zum

anderen aber auch durch eine ausgeprägte Rückhaltung der Proteine durch die Synovialmembran. Er verglich die Pentosidin-Menge bezogen auf das Volumen.

In der vorliegenden Untersuchung bezogen wir die Pentosidin-Menge auf die Masse der in der Flüssigkeit vorliegenden Proteine. Dies erscheint sinnvoll, da die AGE-Bildung hauptsächlich an Proteinen stattfindet. Damit liegt ein vergleichbares Maß für den Anteil der glycierten Proteine vor. Insofern erscheint die Erklärung von Chen et al. 1999 nicht schlüssig, da auch wir einen niedrigeren Synovia-Pentosidin-Spiegel fanden.

Wahrscheinlicher ist eine höhere Bindung an Rezeptoren in der Synovia. Eine verminderte Bildungsrate oder eine erhöhte Clearance erscheint auch möglich. Eine vermehrte Ablagerung von AGEs wurde aber nur für das CML bisher nachgewiesen (Drinda et al. 2001) und entspricht den hier gefundenen signifikant niedrigeren Synovia-CML-Siegeln im Vergleich zu den Serum-Spiegeln. Für das Pentosidin sind bisher keine Untersuchungen zur Lokalisation bekannt.

Eine erhöhte Clearance würde durch die hyperämisierte entzündete Synovia begünstigt. Allerdings müssten bei solchen Unterschieden zwischen Serum- und Synovia-Spiegeln aktive Prozesse beteiligt sein. Dafür gibt es nach bisherigem Kenntnisstand keinen Anhalt.

Vergleicht man die AGE-Spiegel mit dem Alter bzw. der Krankheitsdauer, so finden sich signifikante positive Korrelationen nur zwischen dem Synovia-Pentosidin und der Krankheitsdauer. Im Gegensatz dazu fand Takahashi et al. 1997 eine signifikante Korrelation zwischen dem Serum-Pentosidin und dem Alter, aber nicht mit der Krankheitsdauer. Dem Zusammenhang mit dem Alter widersprach aber Rodriguez-Garcia et al. 1998, der keine Korrelation zwischen dem Serum-Pentosidin und dem Alter bei RA-Patienten fand.

Wenn man davon ausgeht, dass die RA vermittelt über oxidativen Stress zur übernormalen Akkumulation von AGEs insbesondere Pentosidin beiträgt, ist vorstellbar, dass sich die Krankheitsdauer auf den Pentosidin-Spiegel auswirkt. Dieser Zusammenhang fand sich aber nur in der Synovia, die zwar Hauptmanifestationsort der RA ist, aber bei einer Korrelation zwischen Serum- und Synovia-Pentosidin ist dieser Befund nicht ganz schlüssig. Er wäre aber ein deutlicher Hinweis für den Einfluss der RA auf die Bildung von Pentosidin insbesondere intraartikulär.

Bei der Untersuchung der Abhängigkeit der Pentosidin-Spiegel vom erreichten Destruktionsgrad gemessen anhand des Röntgenstadiums nach Steinbrocker stellt man fest, dass mit steigendem Röntgenstadium höhere Serum-Pentosidin-Spiegel erreicht werden, wobei die Unterschiede in den höheren Stadien geringer werden. Eine Ausnahme stellt das Stadium 0 dar. In diesem Stadium wurden die höchsten Serum-Pentosidin-Spiegel erreicht. Allerdings

lässt eine Gruppengröße von 3 Probanden eine Einbeziehung in die Untersuchung nicht sinnvoll erscheinen. Unterschiede zwischen allen Gruppen ließen sich allerdings nicht statistisch sichern.

Betrachtet man die Synovia-Pentosidin-Spiegel, zeigt sich eine Zunahme der Spiegel-Höhe mit steigendem Röntgenstadium, mit Ausnahme des Stadiums 3, das geringere Spiegel als das Stadium 2 aufweist. Das Stadium 4 erreicht aber die höchsten Werte. Auch diese Unterschiede sind nicht statistisch signifikant. Ab dem Röntgenstadium 2 erreichen die Synovia-Pentosidin-Spiegel höhere Werte als die Serum-Pentosidin-Spiegel, ebenfalls ohne statistische Sicherheit. Studien, die die Serum-Spiegel mit den Synovia-Spiegeln in Abhängigkeit vom Röntgenstadium vergleichen, liegen nicht vor. Dieser Befund widerspricht auch den Ergebnissen der Gesamt-RA-Gruppe, in der die Serum-Spiegel höher als die Synovia-Spiegel sind. Die Patientenzahl je Röntgenstadium ist auch zum Teil recht gering, so dass diese Werte nicht repräsentativ sein könnten. Sollte sich aber dieser Befund in größeren Patientenkollektiven bestätigen, wäre dies ein sehr deutlicher Hinweis darauf, dass es besonders im Gelenk zu einer bedeutenden Pentosidin-Entstehung kommt, also lokale Einflüsse die Entstehung fördern, wie zum Beispiel Zytokin-induzierte Veränderungen des oxidativen Milieus. Das Serum-CML steigt mit dem Röntgenstadium an. In den größeren Patientenkollektiven in den Röntgenstadien 1 bis 3 ist dieser Unterschied allerdings nur marginal. Das Röntgenstadium 4 erreicht die höchsten Serum-CML-Werte. Diese Ergebnisse sind aber nicht statistisch sicher. Alle dazugehörigen Synovia-CML-Spiegel sind geringer. Hier erreicht das Röntgenstadium 1 die höchsten Werte, gefolgt vom Röntgenstadium 4, dann 2 und die kleinsten Spiegel beim Röntgensatdium 3. Die diesem Synovia-CML-Vergleich zugrunde liegenden Probandengruppen sind aber äußerst klein, so dass hier keine verlässlichen Aussagen zu treffen sind.

Chen et al. 1999 vergleicht die Pentosidin-Spiegel der Stadien 1 und 2 mit denen der Stadien 3 und 4 sowohl der röntgenologischen, als auch der funktionellen Einteilung. Er fand keinerlei signifikante Unterschiede. Dieses Ergebnis bestätigt die vorgelegte Arbeit, bezüglich der röntgenologischen Einteilung. Allerdings gibt Chen et al. 1999 weder das untersuchte Medium noch die konkreten Daten zu diesem Vergleich an.

Auch Takahashi et al. 1997 untersuchte die Abhängigkeit der Serum-Pentosidin-Spiegel vom erreichten Röntgenstadium. Er fand steigende Spiegel vom Stadium 1 bis 3, allerdings die niedrigsten Spiegel im Stadium 4. Eine statistische Sicherung gelang auch ihm nicht. Er interpretierte die erniedrigten Spiegel im Stadium 4 so, dass dieses fortgeschrittene Stadium eine sogenannte „ausgebrannte“ Form darstellt, also ein Zustand ist mit zwar erheblicher

Gelenkzerstörung und damit Beeinträchtigung des Patienten, aber nur noch geringer entzündlicher Aktivität. Damit fehlt auch der Beitrag des oxidativen Stresses zur Akkumulation des Pentosidins. Das klingt schlüssig, aber die Ergebnisse werden durch die vorgelegte Arbeit nicht bestätigt. Allerdings besteht auch bei Takahashi et al. 1997 das Problem, dass die Patientengruppe des Stadiums 4 nur sehr klein ist, womit die Verlässlichkeit des Ergebnisses sehr in Frage steht.

Zusätzlich untersuchte Takahashi et al. 1997 noch die Abhängigkeit der Serum-Pentosidin-Spiegel vom Stadium der funktionellen Einschränkung. Hier fließt also nicht nur die radiologische Zerstörung ein, sondern auch die entzündliche Aktivität. Vom Stadium 1 bis 3 stiegen die Serum-Spiegel an. Dieser Unterschied war auch statistisch signifikant. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Gelenkentzündung einen entscheidenden Einfluss hat. Ein Zusammenhang zwischen den AGEs und den Entzündungsmarkern konnte nur zwischen dem Serum-Pentosidin und dem CrP sowie der BSG gefunden werden. Hier besteht jeweils eine signifikante positive Korrelation nach Spearman. Eine Untersuchung mit dem lokalen akuten Entzündungsmarker, der Leukozytenzahl im Synovia-Punktat, erbrachte keine statistisch signifikanten Ergebnisse.

In weiterführenden Untersuchungen, die kurz vor der Publikation stehen (Rheumatology International), fanden wir zusätzlich noch eine signifikante positive Korrelation zwischen dem Serum-Pentosidin und dem IL-6. Das IL-6 ist eines der Zytokine, die die antigenlose Lymphozytenaktivierung begünstigen. Sollte in Zukunft bewiesen werden, dass das IL-6 NFκB-abhängig durch die AGE-RAGE-Interaktion induziert wird, wäre dies der Beweis für den Einfluss der AGEs auf die Pathogenese der RA.

In den veröffentlichten Studien zu diesem Thema wurden Zusammenhänge zwischen den Serum- bzw. Plasma-Pentosidin-Spiegeln und der BSG, des CrP sowie klinischen Entzündungsmarkern, z.B. der Gelenkstatus und die Dauer der Morgensteifigkeit, gefunden (Takahashi et al. 1997, Miyata et al. 1998, Chen et al. 1999). Auch für die Synovia-Pentosidin-Spiegel konnte zum Teil dieser Zusammenhang nachgewiesen werden (Chen et al. 1998, Chen et al. 1999). In der vorgelegten Arbeit wird dieser Zusammenhang für das Serum-Pentosidin und dem CrP sowie der BSG bestätigt. Die Synoviazellzahl wurde bisher in keiner veröffentlichten Studie verglichen. Auch Studien zum CML liegen nicht vor.

Beim Vergleich der Studien fällt allerdings auf, dass die signifikant ermittelten Korrelationsfaktoren zwischen 0,2 und 0,35 liegen. In der hier vorgelegten Untersuchung sogar nur um 0,18. Dies weist darauf hin, dass es hier wesentliche, andere Einflussfaktoren gibt.

Die AGEs steigen mit zunehmendem Alter an. Dies kann dazu führen, dass ihre Bildung die Eliminationsrate übersteigt. Eine übernormale Akkumulationsrate kann insbesondere verursacht werden durch eine verminderte Ausscheidung, wie dies bei der chronischen Niereninsuffizienz zum Teil der Fall ist, aber auch durch eine erhöhte Bildungsrate, wie zum Beispiel beim Diabetes mellitus bedingt durch eine Hyperglycämie oder bei der RA, durch den erhöhten oxidativen Stress verursacht. Pentosidin entsteht durch Glycierung von Proteinen. Da das Albumin die größte Proteinfraction im Blut darstellt, ist auch hier der größte Pentosidinanteil zu vermuten und unterliegt damit dem Turn-over des Albumin (Miyata et al. 1996d). Aber auch andere Proteine, einschließlich der Strukturproteine, wie zum Beispiel das Kollagen, werden glyciert. Möglicherweise liegt der Turn-over der langlebigen Strukturproteine der lebenszeitlichen AGE-Akkumulation zu Grunde. Auf jeden Fall ist dieser Prozess langwieriger.

Die Entzündungsmarker CrP und BSG stellen aber kurzfristig veränderliche Parameter dar. Wenn auch bei der RA chronisch erhöhte CrP- und BSG-Werte zu erwarten sind, muss man davon ausgehen, dass ein nicht unerheblicher Anteil des Patientenkollektivs wegen einer Verschlechterung, das heißt einer zunehmenden Entzündungsaktivität, sich in der rheumatologischen Fachsprechstunde vorstellten. Auch das Vorliegen eines Gelenkergusses deutet eine überdurchschnittliche Entzündungsaktivität an. Dies könnte die geringen Korrelationsfaktoren erklären. Das grundsätzliche Problem ist also der Vergleich eines schnell reagierenden Parameters, den Entzündungsmarkern, mit einem langsam reagierenden Parameter, den AGEs. Einen eher langfristigen Charakter weisen auch die Rheumafaktoren, also Antikörper gegen den Fc-Teil des IgG, auf. Sie geben je nach Subtyp einen Anhalt für die Ausprägungsform der RA. Eine Korrelation mit der Krankheitsaktivität gibt es nicht. (Gräfenstein 1992)

Der Rheumafaktor korreliert signifikant nach Pearson, also linear, mit dem Serum- als auch Synovia-CML. Für die Pentosidin-Spiegel ließ sich dieser Zusammenhang nicht nachweisen. Auch eine Korrelation nach Spearman fand sich nicht. Dies widerspricht den Ergebnissen von Takahashi et al. 1997, der eine signifikante Korrelation nach Spearman zwischen dem Serum-Pentosidin und dem Rheumafaktor fand.

Ligier et al. 1998 fand bei RA-Patienten einen höheren Anteil von CML-Glycierung an IgG, wenn die Patienten auch einen Antikörper gegen dieses AGE bilden. Weiterhin ist der Subtyp IgM-anti-IgG stark assoziiert mit dem Rheumafaktor, aber nicht identisch. Folglich zeigt Ligier et al. 1998 einen Zusammenhang zwischen dem CML und dem Rheumafaktor. Dies entspricht den hier vorgestellten Ergebnissen.

In der vorangegangenen Darstellung wird an mehreren Stellen deutlich, dass die AGEs einen Einfluss auf die Pathogenese, möglicherweise sogar auf die Ätiologie der RA haben könnten. So sind die Serum-Pentosidin-Spiegel signifikant erhöht gegenüber denen bei Gesunden. Dies trifft ausschließlich für die RA, nicht für die anderen Gelenkerkrankungen zu. Des weiteren fanden sich signifikante Korrelationen zwischen dem Synovia-Pentosidin und der Krankheitsdauer. Die durchaus wahrscheinliche pathogenetische Bedeutung der AGEs wird am deutlichsten in den Korrelationen zwischen dem Serum-Pentosidin und den Entzündungsmarkern BSG, CrP und insbesondere dem IL-6, welche in zusätzlichen Studien gefunden wurde. Das CML zeigt einige Parallelen zum Rheumafaktor, möglicherweise kommt ihm eine prognostische Bedeutung zu.

7 SCHLUSSFOLGERUNG

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass RA-Patienten signifikant erhöhte Pentosidin-Spiegel im Serum verglichen mit Gesunden aufweisen. Auch im Vergleich mit den SpA-Patienten erreichen RA-Patienten signifikant erhöhte Serum-Pentosidin-Spiegel. Ursache hierfür dürfte ein ausgeprägter oxidativer Stress sein. Unterschiede zwischen der RA und Arthrose deuten sich zwar mit höheren Pentosidin-Spiegeln in Serum und Synovia von RA-Patienten an, der Nachweis eines statistisch sicheren Unterschiedes gelang aber nicht.

Was das AGE CML betrifft, so lassen sich bei Gesunden die höchsten Serum-CML-Spiegel messen, die sogar signifikant höher sind im Vergleich zu den RA-Patienten. Ursachen für dieses differente Verhalten sind vermutlich unterschiedliche Bildungs- aber auch Bindungsvorgänge, wobei sowohl das Reaktionsmilieu, die Anwesenheit bestimmter Precursor als auch unterschiedliche Ausgangsproteine mit unterschiedlichem Turn-over von Bedeutung sein könnten.

Eine signifikante positive Korrelation konnte in der vorliegenden Arbeit zwischen der Krankheitsdauer und dem Synovia-Pentosidin-Spiegel bei RA-Patienten gefunden werden. Signifikante Korrelationen mit dem Alter fanden sich aber nicht. Dies ist ein Hinweis darauf, dass krankheitsassoziierte Mechanismen der RA den normalerweise nachweisbaren Einfluss des Alters auf die Pentosidin-Entstehung übersteigen.

Eine längerfristige erhöhte Entzündungsaktivität ist mit einem progredienteren Verlauf der RA assoziiert. Eine signifikante Korrelation wurde auch zwischen der BSG sowie dem CrP mit dem Serum-Pentosidin bei der RA gefunden. In kurz vor der Veröffentlichung (Rheumatology International) stehenden weiterführenden Studien fanden wir auch einen Zusammenhang mit dem IL-6, einem weiteren Entzündungsmarker. Das bedeutet: je höher die serologische Prozessaktivität, um so höher ist der Serum-Pentosidin-Spiegel. Problematisch ist dieser Vergleich allerdings, da hierbei schnell veränderliche Parameter, die Entzündungsmarker, mit einem langsam veränderlichen Parameter, dem AGE Pentosidin, verglichen wurden. Dies könnte aber die relativ geringen, wenn gleich immer noch signifikanten Korrelationsfaktoren erklären.

Eher längerfristig reagiert auch der Rheumafaktor. Hier fand sich eine signifikante positive Korrelation nach Spearman mit dem CML-Spiegel sowohl im Serum als auch in der Synovia. Die AGEs haben ein hohes pathogenetisches Potential. Zum Einen über die Initiierung und Perpetuierung von oxidativem Stress, zum anderen über die zusätzliche Quervernetzung von

Proteinen, die dadurch einer reduzierten Proteolyse unterliegen und durch Neoepitop-Generierung auch immunogen werden könnten.

Sehr wahrscheinlich ist, dass die AGEs den Entzündungsprozess modulieren. Daher erscheint das AGE-Konzept zur Entwicklung von kausal-wirkenden Therapien sinnvoll. Ansätze hierfür gibt es aber lediglich zur Prävention von diabetischen Folgeschäden. Therapeutische Ansätze zur Behandlung der RA existieren diesbezüglich noch nicht.

Pentosidin führt weiterhin noch zu einer Aktivierung der Osteoklasten. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die Ausbildung der gelenknahen Knochenerosion bzw. -destruktion, aber auch der gelenknahen Osteoporose sein. Es bleibt abzuwarten, ob eine Hemmung der Pentosidin-Entstehung einen therapeutischen oder protektiven Effekt hat.

Falls AGEs eine pathogenetische Bedeutung haben, in dem sie zur Bildung immunogener Neoepitope beitragen, müssten hier noch weitere Faktoren eine Rolle spielen, da sich AGEs mit zunehmendem Alter anreichern und nicht alle alternden Menschen eine RA entwickeln. Auch Erkrankungen mit deutlich übernormalen AGE-Spiegeln, wie zum Beispiel der Diabetes mellitus und die chronische Niereninsuffizienz prädestinieren nicht für eine RA.

Aber auch eine antigenlose Lymphozytenaktivierung, die „bystander“-Aktivierung, könnte pathogenetisch bedeutsam sein. Diese wird durch unterschiedliche Zytokine hervorgerufen, unter anderem durch das IL-6. In weiterführenden Untersuchungen fanden wir, wie bereits erwähnt, einen Zusammenhang zwischen dem Pentosidin und dem IL-6. Die bisher bekannten Effekte der AGEs legen zwar den Verdacht nahe, dass die Erhöhung des IL-6 durch das Pentosidin RAGE-vermittelt und NFκB-abhängig verursacht sein könnte. Diese Hypothese kann allerdings bisher für diesen konkreten Fall nicht bewiesen werden und bleibt daher spekulativ.

Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Bedeutung der AGEs für die Pathogenese der RA zu verstehen. So bleibt die Frage offen, ob mögliche pathogene Prozesse der AGEs über die Wirkung des RAGE mit dem daraus resultierenden oxidativen Stress, die pathologische Quervernetzung der Proteine oder eventuell auch durch immunogene bzw. allergene Stoffwechselprodukte bedingt sein könnten.

Zusammengefasst bietet das AGE-Konzept eine Reihe von Ansatzpunkten zur Erklärung pathogenetisch bedeutsamer Phänomene, nicht nur bei der RA. Daher könnten weitere Untersuchungen Erfolg versprechende therapeutische Ansätze ergeben.

8 LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS

Abel M, Ritthaler U, Zhang Y, Deng Y, Schmidt AM, Greten J, Sernau T, Wahl P, Andrassy K, Ritz E. 1995. Expression of receptors for advanced glycosylated end products in renal disease. *Nephrol Dial Transplant*, 10(9):1662-1667.

Ahmed MU, Brinkmann Frye E, Degenhardt TP, Thorpe S, Baynes JW. 1997. N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem J*, 324(Pt2):565-570.

Andersson U, Erlandsson-Harris H, Yang H, Tracey KJ. 2002. HMGB-1 as a DNA-binding cytokine. *J Leukoc Biol*, 72(6):1084-1091.

Arend WP. 2001. Cytokine imbalance in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of interleukin-1 receptor antagonist. *Semin Arthritis Rheum*, 5(Suppl2):1-6.

Argirova M, Breipohl W. 2002. Comparison between modification of lens proteins resulted from glycation with methylglyoxal, glyoxal, ascorbic acid and fructose. *J Biochem Mol Toxicol*, 16(3):140-145.

Arnalich F, de Miguel E, Martinez M, Vazquez JJ, Gijon-Banos J, Hernanz A. 1994. Neuropeptides and interleukin-6 in human joint inflammation: relationship between intraarticular substance P and interleukin-6 concentration. *Neurosci Lett*, 170(2):251-254.

Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS. 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 31(3):315-324.

Asif M, Egan J, Vasan S, Jyothirmayi GN, Masurekar MR, Lopez S, Williams C, Torres RL, Wagle D, Ulrich P, Cerami A, Brines M, Regan TJ. 2000. An advanced glycation endproduct cross-link breaker can reverse age-related increases in myocardial stiffness. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(6):2809-2813.

Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M. 1995. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science*, 270(5234):286-290.

Bacon PA, Stevens RJ, Carruthers DM, Young SP, Kitas GD. 2002. Accelerated atherogenesis in autoimmune rheumatic disease. *Autoimmun Rev*, 1(6):338-347.

Baenkler HW. 1997. Rheumatische und immunologische Erkrankungen. In: Hahn JM, Hrsg. *Checkliste Innere Medizin*. Erste Aufl. Stuttgart : Georg Thieme Verlag, 428-431.

Baeuerle PA, Baltimore D. 1996. NF-kappa B: ten years after. *Cell*, 87(1):13-20.

Bamberger CM, Schulte HM. 1997. Wirkungsmechanismus der Glucocorticoide. *Internist*, 38(4):366-370.

Bann HF, Higgins PJ. 1981. Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science*, 213(4504):222-224.

Bar KJ, Franke S, Wenda B, Muller S, Kientsch-Engel R, Stein G, Sauer H. 2003. Pentosidine and N(epsilon)-(carboxymethyl)-lysine in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurobiol Aging*, 24(2):333-338.

Bashir S, Harris G, Denman MA, Blake DR, Winyard PG. 1993. Oxidative DNA damage and cellular sensitivity to oxidative stress in human autoimmune disease. *Ann Rheum Dis*, 52(9):659-666.

Basta G, Lazzerini G, Massaro M, Simoncini T, Tanganelli P, Fu C, Kislinger T, Stern DM, Schmidt AM, De Caterina R. 2002. Advanced glycation end products activate endothelium through signaltransduction receptor RAGE: a mechanism for amplification of inflammatory responses. *Circulation*, 105(7):816-822.

Baynes JW. 1991. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, 40(4):405-412.

Baynes JW. 2001. The role of AGEs in aging: causation or correlation. *Exp Gerontol*, 36(9):1527-1537.

Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, Luther T, Quehenberger P, Tritschler H, Wahl P, Ziegler R, Muller M, Nawroth PP. 1997. Advanced glycation end product (AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation*, 96(7):2262-2271.

Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. 1998. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res*, 37(3):586-600.

Bosch T. 2003. Recent advances in therapeutic apheresis. *J Artif Organs*, 6(1):1-8.

Bresnihan B, Lookabaugh J, Witt K, Mukisic P. 1996. Treatment with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist (rhuIL-1ra) in rheumatoid arthritis: Results of a randomized double-blind, placebo-controlled multicenter study. *Arthritis Rheum*, 39(Suppl9):73.

Bresnihan B, Alvaro-Garcia JM, Cobby M, Doherty M, Domljan Z, Emery P, Nuki G, Pavelka K, Rau R, Rozman B, Watt I, Williams B, Aitchison R, McCabe D, Musikic P. 1998. Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum*, 41(12):2196-2204.

Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. 1988. Advanced glycation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med*, 318(20):1315-1321.

Bucala R, Model P, Cerami A. 1984. Modification of DNA by reducing sugars: a possible mechanism for nucleic acid aging and age-related dysfunction in gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81(1):105-109.

Bucala R, Mikata Z, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H. 1993. Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90(14):6434-6438.

- Bucala R, Mikata Z, Vega G, Grundy S, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H. 1994. Modification of low density lipoprotein by advanced glycosylation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(20):9441-9445.
- Burmester GR, Yu DT, Irani AM, Kunkel HG, Winchester RJ. 1981. Ia+ T cells in synovial fluid and tissues of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 24(11):1370-1376.
- Buttice G, Quinones S, Kurkinen M. 1991. The AP-1 site is required for basal expression but is not necessary for TPA-response of the human stromelysin gene. *Nucleic Acids Res*, 19(13):3723-3731.
- Cairns JS, Curtsinger JM, Dahl CA, Freeman S, Alter BJ, Bach FH. 1985. Sequence polymorphism of HLA DR beta 1 alleles relating to T-cell-recognized determinants. *Nature*, 317(6033):166-168.
- Castellani R, Smith MA, Richy PL, Perry G. 1996. Glyoxidation and oxidative stress in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease. *Brain Research*, 737(1-2):195-200.
- Catrina AI, Lampa J, Ernestam S, af Klint E, Bratt J, Klareskog L, Ulfgren AK. 2002. Anti-tumor necrosis factor (TNF)-alpha therapy (etanercept) down-regulates serum matrix metalloproteinase (MMP)-3 and MMP-1 in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 41(5):484-489.
- Chen JR, Takahashi M, Suzuki M, Kushida K, Miyamoto S, Inoue T. 1998. Pentosidine in synovial fluid in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: relationship with disease activity in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 25(12):2440-2444.
- Chen JR, Takahashi M, Suzuki M, Kushida K, Miyamoto S, Inoue T. 1999. Comparison of the concentration of pentosidine in the synovial fluid, serum and urine of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 38(12):1275-1278.
- Colaco CA, Ledesma MD, Harrington CR, Avila J. 1996. The role of the Maillard reaction in other pathologies: Alzheimer's disease. *Nephrol Dial Transplant*, 11(Suppl5):7-12.

- Cush JJ, Lipsky PE. 1988. Phenotypic analysis of synovial tissue and peripheral blood lymphocytes isolated from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 31(10):1230-1238.
- Daimon M, Ono Y, Saito T, Yamaguchi H, Hirata A, Ohnuma H, Igarashi M, Eguhi H, Manaka H, Kato T. 1999. Increased serum levels of pentosidine, but not carboxymethyl-lysine, in type 2 diabetes without obvious diabetic nephropathy. *Diabetes Care*, 22(5):877-878.
- Dawczynski J, Franke S, Blum M, Kasper M, Stein G, Strobel J. 2002. Advanced glycation end-products in corneas of patients with keratoconus. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 240(4):296-301.
- DeGroot J, Verzijl N, Bank RA, Lafeber FP, Bijlsma JW, TeKoppele JM. 1999. Age-related decrease in proteoglycan synthesis of human articular chondrocytes: the role of nonenzymatic glycation. *Arthritis Rheum*, 42(5):1003-1009.
- DeGroot J, Verzijl N, Budde M, Bijlsma JW, Lafeber FP, TeKoppele JM. 2001. Accumulation of advanced glycation end products decreases collagen turnover by bovine chondrocytes. *Exp Cell Res*, 266(2):303-310.
- Del Rincon I, Williams K, Stern MP, Freeman GL, O'Leary DH, Escalante A. 2003. Association between carotid atherosclerosis and marker of inflammation in rheumatoid arthritis patients and healthy subjects. *Arthritis Rheum*, 48(7):1833-1840.
- Deodhar A, Allen E, Daoud K, Wahba I. 2002. Vasculitis secondary to staphylococcal Protein A immunoadsorption (Prosorba column) treatment in rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum*, 32(1):3-9.
- Drinda S, Franke S, Canet CC, Petrow P, Bräuer R, Hütich C, Stein G, Hein G. 2001. Identification of the advanced glycation end products N(epsilon)-carboxymethyllysine in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 61(6):488-492.

- Drosos AA, Alamanos I, Voulgari PV, Psychos DN, Katsaraki A, Papadopoulos I, Dimou G, Siozos C. 1997. Epidemiology of adult rheumatoid arthritis in northwest Greece 1987-1995. *J Rheumatol*, 24(11):2129-2133.
- Drossaers-Bakker KW, de Buck M, van Zeben D, Zwindermann AH, Breedveld FC, Hazes JM. 1999. Long-term course and outcome of functional capacity in rheumatoid arthritis: the effect of disease activity and radiologic damage over time. *Arthritis Rheum*, 42(9):1854-1860.
- Dunn JA, McCane DR, Thorpe SR, Lyons TJ, Baynes JW. 1991. Age-dependent accumulation of N epsilon-(carboxymethyl)lysine and N epsilon-(arboxymethyl)hydroxylysine in human skin collagen. *Biochemistry*, 30(5):1205-1210.
- Edelstein D, Brownlee M. 1992. Mechanistic studies of advanced glycosylation endproduct inhibition by aminoguanidine. *Diabetes*, 41(1):26-29.
- Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, Katsikis P, Brennan FM, Walker J, Bijl H, Ghayeb J. 1993. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum*, 36(12):1681-1690.
- Firestein GS, Zvaifler NJ. 1987. Peripheral blood and synovial fluid monocyte activation in inflammatory arthritis. II. Low levels of synovial fluid and synovial tissue interferon suggest that gamma-interferon is not the primary macrophage activating factor. *Arthritis Rheum*, 30(8):864-871.
- Foell D, Kucharzik T, Kraft M, Vogl T, Sorg C, Domschke W, Roth J. 2003a. Neutrophil derived human S100A12 (EN-RAGE) is strongly expressed during chronic active inflammatory bowel disease. *Gut*, 52(6):847-853.
- Foell D, Kane D, Bresnihan B, Vogl T, Nacken W, Sorg C, Fitzgerald O, Roth J. 2003b. Expression of the pro-inflammatory protein S100A12 (EN-RAGE) in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 42(11):1383-1389.
- Friedman EA. 1999a. Advanced glycation end-products in diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, 14(Suppl3):1-9.

- Friedman EA. 1999b. Advanced glycosylated end products and hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care*, 22(Suppl2):B65-B71.
- Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Raz A, Needleman P. 1990. The induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem*, 265(28):16737-16740.
- Gabriel SE, Crowson CS, O'Fallon WM. 1999. The epidemiology of rheumatoid arthritis in Rochester, Minnesota, 1955-1985. *Arthritis Rheum*, 42(3):415-420.
- Gabriel SE, Crowson CS, Kremers HM, Doran MF, Turesson C, O'Fallon WM, Matteson EL. 2003. Survival in rheumatoid arthritis: a population-based analysis of trends over 40 years. *Arthritis Rheum*, 48(1):54-58.
- Gause A, Berek C. 2001. Role of B cells in the pathogenesis of rheumatoid arthritis: potential implications for treatment. *Bio Drugs*, 15(2):73-79.
- Geiler T, Lorenz HM, Kalden JR, Manger B. 1997. Pathogenese der rheumatoiden Arthritis. *Med Klin*, 92(6):347-353.
- Giacomelli R, Cipriani P, Matucci Cerinic M, Fulminis A, Barattelli G, Pingiotti E, Di Franco M, Trotta A, Perricone R, Zazzeroni F, Alesse E, Tonietti G. 2002. Combination therapy with cyclosporine and methotrexat in patients with early rheumatoid arthritis soon inhibits TNF α production without decreasing TNF α mRNA levels. An in vivo and in vitro study. *Clin Exp Rheumatol*, 20(3):365-372.
- Giap AQ, Tarnawski A, Hoa NT, Akotia V, Ma TY. 2002. NSAID inhibition of RGM1 gastric monolayer wound re-epithelialization: omparsion of selective COX-2 versus non-selective COX inhibitors. *Life Sci*, 70(25):3029-3037.
- Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. 1994. Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. A model for intracellular glycosylation in diabetes. *J Clin Invest*, 94(1):110-117.

- Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. 1996. BCL-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation endproducts in bovine endothelial cells. *J Clin Invest*, 97(6):1422-1428.
- Gibson GJ, Verner JJ, Nelson FR, Lin DL. 2001. Degradation of the cartilage collagen matrix associated with changes in chondrocytes in osteoarthritis. Assessment by loss of background fluorescence and immunodetection of matrix components. *J Orthop Res*, 19(1):33-42.
- Giugliano D, Ceriello A, Paolisso, G. 1996. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diab Care*, 19(3):257-267.
- Goronzy JJ, Bartz-Bazzanella P, Hu W, Jendro MC, Walser-Kuntz DR, Weyand CM. 1994. Dominant clonotypes in the repertoire of peripheral CD4+ T cells in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, 94(5):2068-2076.
- Gouze JN, Ghivizzani SC, Gouze E, Palmer GD, Betz OB, Robbins PD, Evans CH, Herndon JH. 2001. Gene therapy for rheumatoid arthritis. *Hand Surg*, 6(2):211-219.
- Gräfenstein K, Hrsg 1992. *Klinische Rheumatologie*. Erste Aufl. Landsberg/Lech: ecomed Fachverlag, 39-49.
- Grasedyck K. 1998. Gelenke. In: Schettler G, Greten H, Hrsg. *Innere Medizin - Band II*. Neunte Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1237-1260.
- Grimm S, Bauer MK, Baeuerle PA, Schulze-Osthoff K. 1996. Bcl-2 down-regulates the activity of the transcription factor NF-kappaB upon apoptosis. *J Cell Biol*, 134(1):13-23.
- Gugliucci A, Bendayan M. 1995. Histones from diabetic rats contain increased levels of advanced glycation end products. *Biochem Biophys Res Commun*, 212(1):56-62.
- Guillemin F, Briancon S, Klein JM, Sauleau E, Pourel J. 1994. Low incidence of rheumatoid arthritis in France. *Scand J Rheumatol*, 23(5):264-268.

- Hailey D, Topfer LA. 2002. Extracorporal immunoadsorption treatment for rheumatoid arthritis. *Issues Emerg Health Technol*, (28):1-4.
- Haley RJ, Ward DM. 1986. Nonenzymatically glucosylated serum proteins in patients with end-stage renal disease. *Am J Kidney Dis*, 8(2):115-121.
- Hansen KE, Hildebrand JP, Genovese MC, Cush JJ, Patel S, Cooley DA, Cohen SB, Gangnon RE, Schiff MH. 2004. The efficacy of switching from etanercept to infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 31(6):1098-1102.
- Hassan MQ, Hadi RA, Al-Rawi ZS, Padron VA, Stohs SJ. 2001. The glutathione defense system in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Appl Toxicol*, 21(1):69-73.
- Hein G, Eidner G, Eidner T, Marzoll I, Klinner M. 1993. Rheumatoid factor activity, age at manifestation and roentgenologic progression of rheumatoid arthritis - a retrospectiv study. *Z Rheumatol*, 52(6):403-408.
- Hein G, Bolwin R, Bräuer R, Eidner T, Franke S, Oelzner P, Sprott H. 1995. Update Rheumatologie - Teil I - Resümee des klinisch bedeutsamen Kenntnisstandes und Ausblick auf perspektivisch relevante Trends in ätiopathogenetischer Forschung, diagnostischen Methoden und therapeutischen Möglichkeiten. *Med Klin*, 90(4):231-239.
- Hein G, Oelzner P, Sprott H, Manger B. 1999a. Update Rheumatologie - Kenntnisstand zur Ätiopathogenese, Diagnostik und Therapie ausgewählter Arthritisformen - Teil I: Ätiopathogenese und Diagnostik. *Med Klin*, 94(9):485-495.
- Hein G, Eidner T, Oelzner P, Manger B. 1999b. Update Rheumatologie-Teil II Stand und Perspektiven der Pharmakotherapie chronischer Arthritiden. *Med Klin*, 94(10):556-563.
- Hein G, Franke S. 2002. Are advanced glycation end-product-modified proteins of pathogenetic importance in fibromyalgia. *Rheumatology (Oxford)*, 41(10):1163-1167.

Hein G, Wiegand R, Lehmann G, Stein G, Franke S. 2003. Advanced glycation end-products pentosidin and N epsilon-carboxymethyllysine are elevated in serum of patients with osteoporosis. *Rheumatology (Oxford)*, 42(10):1242-1246.

Hori O, Yan SD, Ogawa S, Kuwabara K, Matsumoto M, Stern D, Schmidt AM. 1996. The receptor for advanced glycation end-products has a central role in mediating the effects of advanced glycation end-products on the development of vascular disease in diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant*, 11(Suppl5):13-16.

Hunt JV, Dean RT, Wolff SP. 1988. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation: glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes and aging. *Biochem J*, 256(1):205-212.

Ishii KK, Takahashi Y, Kaku M, Sasaki T. 1999. Role of human parvovirus B19 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Jpn J Infect Dis*, 52(5):201-207.

Jaradat MI, Schnitzlein-Bick CT, Singh GK, Moe SM. 2001. beta(2)-Microglobulin increases the expression of vascular cell adhesion molecule on human synovial fibroblasts. *Kidney Int*, 59(5):1951-1959.

Jorgensen C, Sany J. 1994. Modulation of the immune response by the neuro-endocrine axis in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheum*, 12(4):435-444.

Kiely PD, Johnson, DM. 2002. Infliximab and leflunomide combination therapy in rheumatoid arthritis: an open-label study. *Rheumatology (Oxford)*, 41(6):631-637.

Kirwan JR. 1995. The effect of glucocorticoid and joint destruction in rheumatoid arthritis. The Arthritis and Rheumatism Council Low-Dose Glucocorticoid Study Group. *N Engl J Med*, 333(3):142-146.

Kirwan JR, Kim KK. 1996. Low dose corticosteroids in early rheumatoid arthritis. Can these drugs slow disease progression?. *Drugs Aging*, 8(3):157-161.

Klareskog L, Forsum U, Malmnas Tjernlund UK, Kabelitz D, Wigren A. 1981. Appearance of anti-HLA-DR-reactive cells in normal and rheumatoid synovial tissue. *Scand J Immunol*, 14(2):183-192.

Knecht KJ, Dunn JA, McFarland KF, McCane DR, Lyons TJ, Thorpe SR, Baynes JW. 1991. Effect of diabetes and aging on carboxymethyllysine levels in human urine. *Diabetes*, 40(2):190-196.

Krantz S, Salazar R, Brandt R, Kellermann J, Lottspeich F. 1995. Purification and partial amino acid sequencing of a fructosyllysine-specific binding protein from cell membranes of the monocyte-like cell line U937. *Biochim Biophys Acta*, 1266(1):109-112.

Kuiper S, van Gestel AM, Swinkels HL, de Boo TM, da Silva JA, van Riel PL. 2001. Influence of sex, age and menopausal state on the course of early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 28(8):1809-1816.

Lapadula G, Iannone F, Zuccaro C, Covelli M, Grattagliano V, Pipitone V. 1997. Recovery of erosive rheumatoid arthritis after human immunodeficiency virus-1 infection and hemiplegia. *J Rheumatol*, 24(4):747-751.

Lemaire R, Flipo RM, Monte D, Dupressoir T, Duquesnoy B, Cesbron JY, Janin A, Capron A, Lafyatis R. 1994. Synovial fibroblast-like cell transfection with the SV40 large T antigen induces a transformed phenotype and permits transient tumor formation in immunodeficient mice. *J Rheumatol*, 21(8):1409-1419.

Li YM, Tan AX, Vlassara H. 1995. Antibacterial activity of lysozyme and lactoferrin is inhibited by binding of advanced glycation-modified proteins to a conserved motif. *Nat Med*, 1(10):1057-1061.

Li YM, Mitsushashi T, Wojciechowicz D, Shimizu N, Li J, Stitt A, He C, Banerjee D, Vlassara H. 1996. Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation endproduct receptors: relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80K-H membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(20):11047-11052.

Ligier S, Fortin PR, Newkirk MM. 1998. A new antibody in rheumatoid arthritis targeting glycated IgG: IgM anti-IgG-AGE. *Br J Rheumatol*, 37(12):1307-1314.

Lipsky PE. 1995. Rheumatoide Arthritis. In: Schmailzl KJG, Hrsg. *Harrisons Innere Medizin* 2. Dreizehnte Aufl. Berlin: Blachwell Wissenschafts-Verlag, 1921-1929.

Lipsky PE. 1998. Rheumatoid Arthritis. In: Fauci AS, Hrsg. *Harrison's Principles of Internal Medicine - Volume 2*. Vierzehnte Aufl. New York: MacGraw-Hill Companies, Inc, 1880-1888.

Lucey MD, Newkirk MM, Neville C, Lepage K, Fortin PR. 2000. Association between IgM response to IgG damaged by glyoxidation and disease activity in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 27(2):319-323.

Lunec J, Blake DR. 1985. The determination of dehydroascorbic acid in the serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Free Radic Res Commun*, 1(1):31-39.

Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Davis D, Macfarlane JD, Antoni C, Leeb B, Elliot MJ, Woody JN, Schaible TF, Feldmann M. 1998. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 41(9):1552-1563.

Makino H, Shikata K, Kushiro M, Hironaka K, Yamasaki Y, Sugimoto H, Ota Z, Araki N, Horiuchi S. 1996. Roles of advanced glycation end-products in the progression of diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplantat*, 11(Suppl5):76-80.

Makita Z, Radloff S, Rayfield EJ, Yang Z, Skolnik E, Delaney V, Friedman EA, Cerami A, Vlassara H. 1991. Advanced glycosylation end products in patients with diabetic nephropathy. *N Engl J Med*, 325(12):836-842.

Makita Z, Bucala R, Rayfield EJ, Friedman EA, Kaufman AM, Korbet SM, Barth RH, Winston JA, Fuh H, Manogue KR. 1994. Reactive glycosylation endproducts in diabetic uraemia and treatment of renal failure. *Lancet*, 343(8912):1519-1522.

- Makita Z, Yanagisawa K, Kuwajima S, Bucala R, Vlassara H, Koike T. 1996. The role of advanced glycation end-products in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*, 11(Suppl5):31-33.
- Matsuno H, Yudoh K, Uzuki M, Nakazawa F, Sawai T, Yamaguchi N, Olsen BR, Kimura T. 2002. Treatment with the angiogenesis inhibitor endostatin: a novel therapy in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 29(5):890-895.
- McCarthy AD, Etcheverry SB, Cortizo AM. 1999. Advanced glycation endproduct-specific receptors in rat and mouse osteoblast-like cells: regulation with stages of differentiation. *Acta Diabetol*, 36(1-2):45-52.
- McCarthy AD, Etcheverry SB, Bruzzone L, Lettieri G, Barrio DA, Cortizo AM. 2001. Non-enzymatic glycosylation of type I collagen matrix: effects on osteoblastic development and oxidative stress. *BMC Cell Biol*, 2(1):16.
- McInnes IB, Liew FY. 1998. Interleukin 15: a proinflammatory role in rheumatoid arthritis synovitis. *Immunol Today*, 19(2):75-79.
- Miyata T, Inagi R, Iida Y, Sato M, Yamada N, Oda O, Maeda K, Seo H. 1994. Involvement of beta 2-microglobulin modified with advanced glycation end products in the pathogenesis of hemodialysis-associated amyloidosis. Induction of human monocyte chemotaxis and macrophage secretion of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1. *J Clin Invest*, 93(2):521-528.
- Miyata T, Iida Y, Horie K, Cai Z, Sugiyama S, Maeda K. 1996a. Pathophysiology of advanced glycation end-products in renal failure. *Nephrol Dial Transplant*, 11(Suppl5):27-30.
- Miyata T, Taneda S, Kawai R, Ueda Y, Horiuchi S, Hara M, Maeda K, Monnier VM. 1996b. Identification of pentosidine as a native structure for advanced glycation end product in β 2-microglobulin-containing amyloid fibrils in patients with hemodialysis-related amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93(6):2353-2358.

Miyata T, Kawai R, Taketomi S, Sprague SM. 1996c. Possible involvement of advanced glycation end-products in bone resorption. *Nephrol Dial Transplant*, 11(Suppl5):54-57.

Miyata T, Ueda Y, Shinzato T, Iida Y, Tanaka S, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, Maeda K. 1996d. Accumulation of albumin-linked and free-from pentosidine in the circulation of uremic patients with end-stage renal failure: renal implications in the pathophysiology of pentosidine. *J Am Soc Nephrol*, 7(8):1198-1206.

Miyata T, Notoya K, Yoshida K, Horie K, Maeda K, Kurokawa K, Taketomi S. 1997a. Advanced glycation end product enhance osteoclast-induced bone resorption in cultured mouse unfractionated bone cells and in rats implanted subcutaneously with devitalized bone particles. *J Am Soc Nephrol*, 8(2): 260-270.

Miyata T, Ueda Y, Yoshida A, Sugiyama S, Iida Y, Jadoul M, Maeda K, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C. 1997b. Clearance of pentosidine, an advanced glycation end product, by different modalities of renal replacement therapy. *Kidney Int*, 51(3):880-887.

Miyata T, Ishiguro N, Yasuda Y, Ito T, Nangaku M, Iwata H, Kurokawa K. 1998. Increased pentosidine, an advanced glycation end product, in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and its relation with inflammatory markers. *Biochem Biophys Res Commun*, 244(1):45-49.

Moe SM, Singh GK, Bailey AM. 2000. beta2-microglobulin induces MMP-1 but not TIMP-1 expression in human synovial fibroblasts. *Kidney Int*, 57(5):2023-2034.

Monnier V. 1988. The Maillard reaction in aging, diabetes and nutrition. In: Baynes JW, Monier V, Hrsg. NIH conference. New York: AR Liss, 1-22

Moreland LW, Baumgartner SW, Schiff MH, Tindall EA, Fleischmann RM, Weaver AL, Ettlinger RE, Cohen S, Koopman WJ, Mohler K, Widmer MB, Blosch CM. 1997. Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *N Engl J Med*, 337(3):141-147.

- Moreland LW. 2004. Drugs that block tumour necrosis factor: experience in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacoeconomics*, 22(Suppl2):39-53.
- Mulherin DM, Thurnham DI, Situnayake RD. 1996. Glutathione reductase activity, riboflavin status and disease activity in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 55(11):837-840.
- Müller-Ladner U, Kriegsmann J, Gay RE, Koopman WJ, Gay S, Chatham WW. 1995. Progressive joint destruction in a human immunodeficiency virus-infected patient with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 38(9):1328-1332.
- Müller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE, Gay S. 1996. Synovial fibroblasts of patient with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol*, 149(5):1607-1615.
- Münch G, Thome J, Foley P, Schinzel, R, Riederer, P. 1997. Advanced glycation endproducts in ageing and Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev*, 23(1-2):134-143.
- Nagaraj RH, Sell DR, Prabhakaram M, Orthwerth BJ, Monnier VM. 1991. High correlation between pentosidine protein crosslinks and pigmentation implicates ascorbate oxidation in human lens senescence and cataractogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(22):10257-10261.
- Nawroth PP, Bierhaus A, Vogel GE, Hofmann MA, Zumbach M, Wahl P, Ziegler R. 1999. Nichtenzymatische Glykierung und oxidativer Stress bei chronischen Erkrankungen und Diabetes mellitus. *Med Klin*, 94(1):29- 37.
- Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan YC, Elliston K, Stern D, Shaw A. 1992. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem*, 267(21):14998-15004.
- Newkirk MM, LePage K, Niwa T, Rubin L. 1998. Advanced glycation endproducts (AGE) on IgG, a target for circulating antibodies in North American Indians with rheumatoid arthritis (RA). *Cell Mol Biol*, 44(7):1129-1138.

- Newkirk MM, Goldbach-Mansky R, Lee J, Hoxworth J, McCoy A, Yarboro C, Klippel J, El-Gabalawy HS. 2003. Advanced glycation end-product (AGE)-damaged IgG and IgM autoantibodies to IgG-AGE in patients with early synovitis. *Arthritis Res Ther*, 5(2):R82-R90.
- Niedobitek G, Lisner R, Swoboda B, Rooney N, Fassbender HG, Kirchner T, Aigner T, Herbst H. 2000. Lack of evidence for an involvement of Epstein-Barr virus infection of synovial membranes in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 43(1):151-154.
- Odeh M. 1997. New insights into the pathogenesis and treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol*, 83(2):103-116.
- Ou P, Wolff SP. 1993. Aminoguanidine: a drug proposed for the prophylaxis in diabetes inhibits catalase and generates hydrogen peroxide in vitro. *Biochem Pharmacol*, 46(7):1139-1144.
- Panayi GS. 1997. T-cell-dependent pathways in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol*, 9(3):236-240.
- Panayi GS, Corrigan VM, Pitzalis G. 2001. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. The role of T cells and other Beasts. *Rheum Dis Clin North Am*, 27(2):317-334.
- Pap T, Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S. 2000. Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*, 2(5):361-367.
- Papadopoulos IA, Katsimbri P, Katsaraki A, Temekonidis T, Georgiadis, A, Drosos AA. 2001. Clinical course and outcome of early rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*, 20(5):205-210.
- Pavelka K, Forejtova S, Pavelkova A, Zvarova J, Rovensky J, Tuchynova A. 2002. Analysis of the reasons for DMARD therapy discontinuation in patients with rheumatoid arthritis in the Czech and Slovak republics. *Clin Rheumatol*, 21(3):220-226.

Peruzzi L, Amore A, Cirina P, Trusolino L, Basso G, Ricotti E, Emancipator SN, Marchisio PC, Coppo R. 2000. Integrin expression and IgA nephropathy: in vitro modulation by IgA with altered glycosylation and macromolecular IgA. *Kidney Int*, 58(6):2331-2340.

Pincus T, Marcum SB, Callahan LF. 1992. Longterm drug therapy for rheumatoid arthritis in seven rheumatology private practices: II. Second line drugs and prednisone. *J Rheumatol*, 19(12):1885-1894.

Ponteziere C, Desmoulins D, Agnaray J, Ekindjian OG, Cals MJ. 1990. Comparative proliferation of non-rheumatoid and rheumatoid human synovial cells. *Int J Tissue React*, 12(4):229-236.

Qu Z, Garcia CH, O'Rourke LM, Planck SR, Kohli M, Rosenbaum JT. 1994. Local proliferation of fibroblast-like synoviocytes contributes to synovial hyperplasia. Results of proliferating cell nuclear antigen/cyclin, c-myc, and nucleolar organizer region staining. *Arthritis Rheum*, 37(2):212-220.

Radoff S, Vlassara H, Cerami A. 1988. Characterization of a solubilized cell surface binding protein on macrophages specific for proteins modified nonenzymatically by advanced glycosylated end products. *Arch Biochem Biohys*, 263(2):418-423.

Radoff S, Cerami A, Vlassara H. 1990. Isolation of surface binding protein specific for advanced glycosylation end products from mouse macrophage-derived cell line RAW 264.7. *Diabetes*, 39(12):1510-1518.

Ritthaler U, Deng Y, Zhang Y, Greten J, Abel M, Sido B, Allenberg J, Otto G, Roth H, Bierhaus A. 1995. Expression of receptors for advanced glycation end products in peripheral occlusive vascular disease. *Am J Pathol*, 146(3):688-694.

Ritz E, Deppisch R, Nawroth P. 1994. Toxicity of uraemia--does it come of AGE?. *Nephrol Dial Transplant*, 9(1):1-2.

Rodriguez-Garcia J, Requena JR, Rodriguez-Segade S. 1998. Increased concentrations of serum pentosidine in rheumatoid arthritis. *Clin Chem*, 44(2):250-255.

Rönnelid J, Lysholm J, Engstrom-Laurent A, Klareskog L, Heyman B. 1994. Local anti-type II collagen antibody production in rheumatoid synovial fluid. Evidence for an HLA-DR4-restricted IgG response. *Arthritis Rheum*, 37(7):1023-1029.

Saudek DM, Kay J. 2003. Advanced glycation endproducts and osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep*, 5(1):33-40.

Saxne T, Palladino MA Jr, Heinegard D, Talal N, Wollheim FA. 1988. Detection of tumor necrosis factor alpha but not tumor necrosis factor beta in rheumatoid arthritis synovial fluid and serum. *Arthritis Rheum*, 31(8):1041-1045.

Scheinman RI, Cogswell PC, Lofquist AK, Baldwin AS Jr. 1995. Role of Transcriptional Activation of I kappa B alpha in Mediation of Immunosuppression by Glucocorticoids. *Science*, 270(5234):283-286.

Schleicher ED, Wagner E, Nerlich G. 1997. Increased accumulation of the glyoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest*, 99(3):457-468.

Schmidt AM, Vianna M, Gerlach M, Brett J, Ryan J, Kao J, Esposito C, Hegarty H, Hurley W, Clauss M. 1992. Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J Biol Chem*, 267(21):14987-14997.

Schmidt AM, Hori O, Brett J, Yan SD, Wautier JL, Stern D. 1994a. Cellular receptors for advanced glycation end products. Implications for induction of oxidant stress and cellular dysfunction in the pathogenesis of vascular lesions. *Arterioscler Thromb*, 14(10):1521-1528.

Schmidt AM, Mora R, Cao R, Yan SD, Brett J, Ramakrishnan R, Tsang TC, Simionescu M, Stern D. 1994b. The endothelial cell binding site for advanced glycation end products consists of a complex: an integral membrane protein and a lactoferrin-like polypeptide. *J Biol Chem*, 269(13):9882-9888.

Schwab W, Friess U, Hempel U, Schulze E, Makita Z, Simank HG. 2002.

Immunohistochemical demonstration of (carboxymethyl)lysine protein adducts in normal and osteoarthritic cartilage. *Histochem Cell Biol*, 117(6):541-546.

Scofield RH. 1996. Etiopathogenesis and biochemical and immunological evaluation of spondylarthropathies. *Curr Opin Rheumatol*, 8(4):309-315.

Sebbag M, Parry SL, Brennan FM, Feldmann M. 1997. Cytokine stimulation of T lymphocytes regulates their capacity to induce monocyte production of tumor necrosis factor- α , but not interleukin-10: possible relevance to pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*, 27(3):624-632.

Seemayer CA, Distler O, Kuchen K, Müller-Landner U, Michel BA, Neidhart M, Gay RE, Gay S. 2001. Die Rheumatoide Arthritis : Neuentwicklungen in der Pathogenese unter besonderer Berücksichtigung der synovialen Fibroblasten. *Z Rheumatol*, 60(5):309-318.

Sieper J, Braun J. 1995. Pathogenesis of spondylarthropathies: Persistent bacterial antigen, autoimmunity, or both?. *Arthritis Rheum*, 38(11):1547-1554.

Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. 2001. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*, 44(2):129-146.

Smulders RA, Stehouwer CD, Schalkwijk CG, Donker AJ, van Hinsbergh VW, TeKoppele JM. 1998. Distinct associations of HbA_{1c} and the urinary excretion of pentosidine, an advanced glycosylation end-product, with markers of endothelial function in insulin-dependent diabetes mellitus. *Thromb Haemost*, 80(1):52-57.

Solovyeva NI, Balayevskaya TO, Dilakyan EA, Zakamaldina-Zama TA, Pozdnev VF, Topol LZ, Kisseljov FL. 1995. Proteolytic enzymes at various stages of oncogenic transformation of rat fibroblasts. I. Aspartyl and cysteine proteinases. *Int J Cancer*, 60(4):495-500.

Steinbrocker O, Traeger CH, Batterman RC. 1949. Therapeutic criteria in rheumatoid arthritis. *J Am Med Assoc*, 140(8):659-662.

- Stichtenoth DO, Zeidler H, Frölich JC. 1998. Neue nichtsteroidale Antirheumatika: Selektive Hemmstoffe der induzierbaren Cyclooxygenase. *Med Klin*, 93(7):407-415.
- Suarez G, Rajaram R, Oronsky AL, Gawinowicz MA. 1989. Nonenzymatic glycation of bovine serum albumin by fructose (frucosylation): comparison with Maillard reaction initiated by glucose. *J Biol Chem*, 264(7):3674-3679.
- Sunahara N, Matsunaga S, Mori T, Ijiri K, Sakou T. 1997. Clinical course of conservatively managed rheumatoid arthritis patients with myelopathy. *Spine*, 22(22):2603-2608.
- Tai AW, Newkirk MM. 2000. An autoantibody targeting glycated IgG is associated with elevated serum immune complex in rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol*, 120(1):188-193.
- Takahashi M, Suzuki M, Kushida K, Miyamoto S, Inoue T. 1997. Relationship between pentosidine levels in serum and urine and activity in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*, 36(6):637-642.
- Takahashi M, Hoshino H, Kushida K, Murata H, Baba S, Inoue T. 1998. The advanced glycation, pentosidine, in carpal ligament in patients with carpal tunnel syndrome undergoing hemodialysis: comparison with idiopathic carpal tunnel syndrome. *Nephron*, 80(4):444-449.
- Takata K, Horiuchi S, Araki N, Shiga M, Saitoh M, Morino Y. 1988. Endocytic uptake of nonenzymatically glycosylated proteins is mediated by a scavenger receptor for aldehyde-modified proteins. *J Biol Chem*, 263(29):14819-14825.
- Takata K, Horiuchi S, Araki N, Shiga M, Saitoh M, Morino Y. 1989. Scavenger receptor of human monocytic leukemia cell line (THP-1) and murine macrophages for nonenzymatically glycosylated proteins. *Biochim Biophys Acta*, 986(1):18-26.
- Taniguchi N, Kawahara K, Yone K, Hashiguchi T, Yamakuchi M, Goto M, Inoue K, Yamada S, Ijiri K, Matsunaga S, Nakajima T, Komiya S, Maruyama I. 2003. High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum*, 48(4):971-981.

- Tanji N, Markowitz GS, Fu C, Kislinger T, Taguchi A, Pischetsrieder M, Stern D, Schmidt AM, D'Agati VD. 2000. Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease. *J Am Soc Nephrol*, 11(9):1656-1666.
- Tomita T, Takano H, Tomita N, Morishita R, Kaneko M, Shi K, Takahi K, Nakase T, Kaneda Y, Yoshikawa H, Ochi T. 2000. Transcription factor decoy for NFkappaB inhibits cytokine and adhesion molecule expressions in synovial cells derived from rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 39(7):749-757.
- Trabandt A, Aicher WK, Gay RE, Sukhatme VP, Fassbender HG, Gay S. 1992. Spontaneous expression of immediately-early response genes c-fos and egr-1 in collagenase-producing rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatol Int*, 12(2):53-59.
- Uhlig T, Smedstad LM, Vaglum P, Moum T, Gerard N, Kvien TK. 2000. The course of rheumatoid arthritis and predictors of psychological, physical and radiographic outcome after 5 years of follow-up. *Rheumatology (Oxford)*, 39(7):732-741.
- Unutmaz D, Pileri P, Abrignani S. 1994. Antigen-independent activation of naive and memory resting T cells by a cytokine combination. *J Exp Med*, 180(3):1159-1164.
- van der Lubbe PA, Dijkmans BA, Markusse HM, Nassander U, Breedveld FC. 1995. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of CD4 monoclonal antibody therapy in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 38(8):1097-1106.
- VanderBorghet A, Geusens P, Raus J, Stinissen P. 2001. The autoimmune pathogenesis of rheumatoid arthritis: role of autoreactive T cells and new immunotherapies. *Semin Arthritis Rheum*, 31(3):160-175.
- Vane JR. 1971. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of aspirin-like drugs. *Nat New Biol*, 231(25):232-235.

Vasan S, Zhang X, Zhang X, Kapurniotu A, Bernhagen J, Teichberg S, Basgen J, Wagle D, Shih D, Terlecky I, Bucala R, Cerami A, Egan J, Ulrich P. 1996. An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks in vitro and in vivo. *Nature*, 382(6588):275-278.

Verzijl N, DeGroot J, Ben ZC, Braun-Benjamin O, Maroudas A, Bank RA, Mizrahi J, Schalkwijk CG, Thrope SR, Baynes JW, Bijlsma JW, Lafeber FP, TeKoppele JM. 2002. Crosslinking by advanced glycation end products increase the stiffness of the collagen network in human articular cartilage: a possible mechanism through which age is a risk factor for osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 46(1):114-123.

Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. 1985. High affinity receptor mediated uptake and degradation of glucose modified proteins: a potential mechanism for the removal of senescent macromolecules. *Proc Natl Acad Sci USA*, 82(17):5588-5592.

Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. 1986. The novel macrophage receptor for glucose-modified proteins is distinct from previously described scavenger-receptors. *J Exp Med*, 164(4):1301-1309.

Vlassara H, Bucala R, Striker I. 1994. Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Invest*, 70(2):138-151.

Vlassara H. 1996. Advanced glycation end-products and atherosclerosis. *Ann Med*, 28(5):419-426.

Wallberg-Jonsson S, Johansson H, Ohman ML, Rantapaa-Dahlqvist S. 1999. Extent of inflammation predicts cardiovascular disease and overall mortality in seropositive rheumatoid arthritis. A retrospective cohort study from disease onset. *J Rheumatol*, 26(12):2562-2571.

Wautier JL, Zoukourian C, Chappey O, Wautier MP, Guillausseau PJ, Cao R, Hori O, Stern D, Schmidt AM. 1996. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation and products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J Clin Invest*, 97(1):238-243.

- Weaver AL. 2004. The impact of new biologicals in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 43(Suppl3):III17-III23.
- Wells-Knecht KJ, Zyzak DV, Litchfield JE, Thorpe SR, Baynes JW. 1995. Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry*, 34(11):3702-3709.
- Welsing PM, van Gestel AM, Swinkels HL, Kiemeny LA, van Riel PL. 2001. The relationship between disease activity, joint destruction and functional capacity over course of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 44(9):2009-2017.
- Weyand CM. 2000. New insights into the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 39(Suppl1):3-8.
- Wisotzky J, Sommer M, Schubert K, Stein G. 1996. Die Akkumulation von AGE im Alterungsprozess, bei Diabetes mellitus und bei chronischer Niereninsuffizienz. *Med Klin*, 91(7):454-457.
- Wolfe F, Mitchell DM, Sibley JT, Fries JF, Bloch DA, Williams CA, Spitz PW, Haga M, Kleinheksel SM, Cathey MA. 1994. The mortality of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 37(4):481-494.
- Wollheim FA. 2002. TNF inhibition as therapy for rheumatoid arthritis. *Expert Opin Investig Drugs*, 11(7):947-953.
- Yamamoto T, Ozono K, Miyauchi A, Kasayama S, Kojima Y, Shima M, Okada S. 2001. Role of advanced glycation end products in adynamic bone disease in patients with diabetic nephropathy. *Am J Kidney Dis*, 38(4Suppl1):S161-S164.
- Yamanishi Y, Firestein GS. 2001. Pathogenesis of rheumatoid arthritis: the role of synoviocytes. *Rheum Dis Clin North Am*, 27(2):355-371.

Yamasaki S, Ueki Y, Nakamura H, Yano M, Matsumoto K, Miyake S, Tominaga T, Tominaga M, Eguchi K. 2002. Effect of filtration leukocytapheresis therapy: modulation of white cell enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis. *Artif Organs*, 26(4):378-384.

Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D. 1994. Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem*, 269(13):9889-9897.

Yang Z, Makita Z, Horii Y, Brunelle S, Cerami A, Sehajpal P, Suthanthiran M, Vlassara H. 1991. Two novel rat liver membrane proteins that bind advanced glycosylation endproducts: relationship to macrophage receptor for glucose-modified proteins. *J Exp Med*, 174(3):515-524.

9 LEBENSLAUF

Persönliche Daten:

Name:	Köhler
Vorname:	Markus
Geburtsdatum / -ort:	29.10.1975, Sondershausen
Familienstand:	ledig

Schulbildung:

1982-1990	Polytechnische Oberschule „Hanno Günther“ in Hachelbich / Berka (Wipper)
1990-1991	Franzbergsschule in Sondershausen (Leistungsklasse)
1991-1994	Staatliches Gymnasium Borntal II, später „Porf. Dr. Irmisch“ in Sondershausen
Juni 1994	Abschluss der Allgemeinen Hochschulreife

Wehrdienst:

Juli 1994-Juni 1995	Grundwehrdienst im Panzerbataillon 383 in Bad Frankenhausen
August 2004	Wehrübung in der Luftwaffensanitätsstaffel des Kommandos der 3. Luftwaffendivision in Berlin-Gatow, Ernennung zum Stabsarzt der Reserve

Studium:

1995-2001	Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena
03.12.2001	Bestehen der Ärztlichen Prüfung

Beruf:

Januar 2002- Dezember 2003	Arzt im Praktikum / Assistenzarzt in der Abteilung für Anästhesie / Intensivmedizin des Kyffhäuserkreiskranken- hauses, später DRK-Krankenhauses in Sondershausen
01.07.2003	Verleihung der Approbation als Arzt
seit Januar 2004	Assistenzarzt in der Inneren Abteilung des DRK-Krankenhauses in Sondershausen

Hachelbich, 06.12.2004

Markus Köhler

10 DANKSAGUNG

Meine besonderer Dank gilt meinen Mentoren der Klinik für Innere Medizin III der Friedrich-Schiller-Universität Jena, Funktionsbereich Rheumatologie / Osteologie, Herr Prof. Dr. med. habil. G. E. Hein und Frau Dr. rer. nat. S. Franke für die interessante Themenstellung, geduldige Betreuung und großzügige Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Großen Dank schulde ich auch Herrn PD Dr. med. habil. P. Oelzner für die Überlassung eines umfangreichen Patientenkollektivs. Frau Thiel stand mir stets bei der Bewältigung der labor-technischen Arbeiten hilfreich und mit vielen Hinweisen zur Seite. Den Mitarbeitern der rheumatologischen Ambulanz als auch der Station danke ich für die tatkräftige Unterstützung und das Ermöglichen des Aktenstudiums.

Für die problemlose Bestimmung von Routineparametern bei meinen Studienpatienten bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Institutes für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik sowie den Mitarbeitern des Institutes für Klinische Immunologie.

Mit Hilfe des Institutes für Transfusionsmedizin war es möglich, repräsentative Serum-Proben gesunder Vergleichspersonen zu erhalten. Auch dafür möchte ich mich herzlich bedanken.

11 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. G. E. Hein und Frau Dr. S. Franke,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Hachelbich, 06.12.2004

Markus Köhler